

## INFORMATION TO USERS

This manuscript has been reproduced from the microfilm master. UMI films the text directly from the original or copy submitted. Thus, some thesis and dissertation copies are in typewriter face, while others may be from any type of computer printer.

**The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.** Broken or indistinct print, colored or poor quality illustrations and photographs, print bleedthrough, substandard margins, and improper alignment can adversely affect reproduction.

In the unlikely event that the author did not send UMI a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if unauthorized copyright material had to be removed, a note will indicate the deletion.

Oversize materials (e.g., maps, drawings, charts) are reproduced by sectioning the original, beginning at the upper left-hand corner and continuing from left to right in equal sections with small overlaps. Each original is also photographed in one exposure and is included in reduced form at the back of the book.

Photographs included in the original manuscript have been reproduced xerographically in this copy. Higher quality 6" x 9" black and white photographic prints are available for any photographs or illustrations appearing in this copy for an additional charge. Contact UMI directly to order.

**UMI<sup>®</sup>**

Bell & Howell Information and Learning  
300 North Zeeb Road, Ann Arbor, MI 48106-1346 USA  
800-521-0600

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

CARACTÉRISATION DES EFFETS  
DE L'ADÉNOSINE ET DE LA PROSTAGLANDINE E<sub>2</sub>  
SUR LA GÉNÉRATION DE 3': 5'-ADÉNOSINE MONOPHOSPHATE CYCLIQUE  
ET SUR LA PRODUCTION/SÉCRÉTION DE L'ENDOTHÉLINE-1  
PAR LES CELLULES ÉPITHÉLIALES DE LA TRACHÉE DE COBAYE EN  
CULTURE.

Par

STÉPHANE PELLETIER

Département de pharmacologie

Mémoire présenté à la faculté de médecine

en vue de l'obtention du grade de

maîtrise ès sciences (M. Sc.)

Mai 1998



National Library  
of Canada

Acquisitions and  
Bibliographic Services

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque nationale  
du Canada

Acquisitions et  
services bibliographiques

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file Votre référence*

*Our file Notre référence*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-56955-1

Canada

## TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES .....	ii
LISTE DES FIGURES .....	vii
LISTE DES TABLEAUX .....	ix
RÉSUMÉ .....	x
 <b>1. INTRODUCTION</b> .....	 1
1.1.CELLULES ÉPITHÉLIALES DES VOIES RESPIRATOIRES .....	1
1.1.1. Populations cellulaires .....	1
1.1.2. Fonctions .....	1
1.1.3. Médiateurs influençant les fonctions de l'épithélium .....	3
1.2. LES PROSTAGLANDINES .....	6
1.2.1. Voie de synthèse .....	6
1.2.2. Récepteurs et pharmacologie des récepteurs des prostaglandines .....	7
1.2.3. Fonctions des prostaglandines au niveau des voies aériennes .....	13
1.3. L'ADÉNOSINE .....	14
1.3.1. Voie de synthèse .....	14
1.3.2. Récepteurs de l'adénosine .....	16
1.3.3. Pharmacologie des récepteurs à l'adénosine .....	18
1.3.4. Fonctions de l'adénosine au niveau des voies respiratoires .....	23
1.4. LES ENDOTHÉLINES .....	24
1.4.1. Voie de synthèse .....	24

1.4.2. Fonctions de l'ET-1 au niveau des voies aériennes .....	25
1.5. BUTS DE L'ÉTUDE .....	28
<b>2. MATÉRIEL ET MÉTHODES .....</b>	<b>29</b>
2.1. DISSECTION DES TRACHÉES DE COBAYES .....	29
2.2. ISOLEMENT DES CELLULES ÉPITHÉLIALES DES TRACHÉES DE COBAYES .....	29
2.3. PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES.....	30
2.3.1. Sécrétion d'ET-1 .....	30
2.3.2. Formation d'AMP cyclique .....	31
2.4. MÉTHODES DE DOSAGE .....	32
2.4.1. Dosage de l'irET .....	32
2.4.2. Dosage de l'AMP cyclique .....	33
2.4.3. Dosage des protéines totales .....	34
2.5. SUBSTANCES CHIMIQUES ET PHARMACOLOGIQUES .....	34
2.6. ANALYSE DES DONNÉES .....	35
<b>3. RÉSULTATS .....</b>	<b>37</b>
3.1. PRODUCTION/SÉCRÉTION D'irET .....	37
3.1.1. Production/sécrétion d'irET par les cellules épithéliales de la trachée de cobaye en culture .....	37
3.2. RÔLE DE LA PGE <sub>2</sub> SUR LA PRODUCTION/SÉCRÉTION DE L'ENDOTHÉLINE-1 ET SUR LA FORMATION D'AMP CYCLIQUE PAR L'ÉPITHÉLIUM DES VOIES AÉRIENNES .....	37
3.2.1. Effet de la prostaglandine E <sub>2</sub> sur la production/sécrétion d'endothéline-1 par les cellules épithéliales de la trachée de cobaye .....	37

3.2.2. Effet de la prostaglandine E <sub>2</sub> sur la formation d'AMP cyclique par les cellules épithéliales de la trachée de cobaye .....	38
<b>3.3. CARACTÉRISATION DU RÉCEPTEUR AUX PROSTAGLANDINES RESPONSABLE DE L'AUGMENTATION D'AMP CYCLIQUE ET DE LA DIMINUTION DE LA PRODUCTION/SÉCRÉTION D'ET-1 AU NIVEAU DES CELLULES ÉPITHÉLIALES DE LA TRACHÉE DE COBAYE .....</b>	<b>43</b>
3.3.1. Effets des prostaglandines sur la génération d'AMP cyclique par les cellules épithéliales de la trachée de cobaye en culture .....	43
3.3.2. Effets des analogues synthétiques de la PGE <sub>2</sub> sur la génération d'AMP cyclique par les cellules épithéliales de la trachée de cobaye en culture .....	44
3.3.3. Effets des antagonistes sélectifs EP <sub>4</sub> , le AH23848B et le AH22921X, sur la génération d'AMP cyclique induite par la PGE <sub>2</sub> .....	47
3.3.4. Effet du AH6809 sur la génération d'AMP cyclique induite par la PGE <sub>2</sub> .....	48
3.3.5. Effet du AH23848B sur l'effet inhibiteur de la PGE <sub>2</sub> sur la production d'ET-1 .....	48
<b>3.4. RÔLE DE L'ADÉNOSINE SUR LA PRODUCTION/SÉCRÉTION D'ET-1 ET SUR LA FORMATION D'AMP CYCLIQUE PAR L'ÉPITHÉLIUM DES VOIES AÉRIENNES .....</b>	<b>53</b>
3.4.1. Effet de l'adénosine sur la production/sécrétion d'irET par les cellules épithéliales de la trachée de cobaye .....	53
3.4.2. Effet de l'adénosine sur la génération d'AMP cyclique par les cellules épithéliales de la trachée de cobaye en culture .....	57
<b>3.5. CARACTÉRISATION DU RÉCEPTEUR À L'ADÉNOSINE RESPONSABLE DE L'AUGMENTATION D'AMP CYCLIQUE ET DE LA DIMINUTION DE LA PRODUCTION/SÉCRÉTION D'ET-1 AU NIVEAU DES CELLULES ÉPITHÉLIALES DE LA TRACHÉE DE COBAYE .....</b>	<b>58</b>
3.5.1. Effets de l'adénosine et des analogues de l'adénosine sur la génération d'AMP cyclique par les cellules épithéliales de la trachée de cobaye en culture ....	58
3.5.2. Effets des antagonistes des récepteur à l'adénosine sur la génération d'AMP cyclique par les cellules épithéliales de la trachée de cobaye en culture induite par le NECA .....	61

3.5.3. Effets du XAC et du CGS15943 sur l'inhibition de la production/sécrétion d'ET-1 par les cellules épithéliales de la trachée de cobaye en culture induite par l'adénosine .....	65
3.5.4. Autres récepteurs à l'adénosine .....	65
3.6. EFFET DE L'ADÉNOSINE SUR LA PRODUCTION D'irET STIMULÉE PAR LE LPS .....	71
3.7. CORRÉLATION ENTRE LA FORMATION D'AMP CYCLIQUE ET L'INHIBITION DE LA PRODUCTION D'ET-1 PAR LA PROSTAGLANDINE E <sub>2</sub> ET L'ADÉNOSINE .....	71
<b>4. DISCUSSION .....</b>	<b>73</b>
4.1. PRODUCTION/SÉCRÉTION D'irET PAR LES CELLULES ÉPITHÉLIALES DE LA TRACHÉE DE COBAYE EN CULTURE .....	73
4.2. EFFET DE LA PROSTAGLANDINE E <sub>2</sub> L'ADÉNOSINE SUR LA PRODUCTION/SÉCRÉTION BASALE D'irET PAR LES CELLULES ÉPITHÉLIALES DE LA TRACHÉE DE COBAYE .....	74
4.3. CARACTÉRISATION DU RÉCEPTEUR DE LA PROSTAGLANDINE E <sub>2</sub> SUR LES CELLULES ÉPITHÉLIALES DE LA TRACHÉE DE COBAYE ..	75
4.3.1. Récepteur de la PGE <sub>2</sub> au niveau des cellules épithéliales de la trachée de cobaye .....	75
4.3.2. Comparaison avec d'autres récepteurs de la prostaglandines E <sub>2</sub> du type EP <sub>4</sub> .....	79
4.4. CARACTÉRISATION DU RÉCEPTEUR À L'ADÉNOSINE SUR LES CELLULES ÉPITHÉLIALES DE LA TRACHÉE DE COBAYE .....	81
4.4.1. Récepteur à l'adénosine sur les cellules épithéliales de la trachée de cobaye .....	82
4.4.2. Comparaison avec d'autres récepteurs A <sub>2B</sub> à l'adénosine .....	84
4.5. AUTRES RÉCEPTEURS DE L'ADÉNOSINE SUR LES CELLULES ÉPITHÉLIALES DE LA TRACHÉE DE COBAYE EN CULTURE .....	87

4.6. IMPLICATION DE L'AMP CYCLIQUE DANS LA RÉGULATION DE LA PRODUCTION/SÉCRÉTION D'ET PAR LES CELLULES ÉPITHÉLIALES DE LA TRACHÉE DE COBAYE .....	88
4.7. EFFET DE L'ADÉNOSINE SUR LA PRODUCTION/SÉCRÉTION STIMULÉE D'ET-1 PAR LES CELLULES ÉPITHÉLIALES DE LA TRACHÉE DE COBAYE .....	91
4.8. IMPLICATION DE L'ADÉNOSINE ET DE LA PROSTAGLANDINE E <sub>2</sub> SUR LES PLANS PHYSIOLOGIQUE ET PAHOPHYSIOLOGIQUE .....	91
4.9. COMPARAISONS ENTRE LES EFFETS DE L'ADÉNOSINE ET DE LA PGE <sub>2</sub> SUR LA GÉNÉRATION D'AMP CYCLIQUE.....	93
5. CONCLUSION .....	95
6. REMERCIEMENTS .....	97
7. RÉFÉRENCES .....	99



## LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Voie de biosynthèse des différentes prostaglandines.....	5
Figure 2.	Voie de biosynthèse de l'adénosine .....	15
Figure 3.	Isoformes des endothélines .....	26
Figure 4.	Voie de biosynthèse de l'Endothéline-1 .....	27
Figure 5.	Production/sécrétion basale d'irET par les cellules épithéliales de la trachée de cobaye .....	39
Figure 6.	Effet de la prostaglandine E <sub>2</sub> sur la production/sécrétion basale d'irET par les cellules épithéliales de la trachée de cobaye .....	40
Figure 7.	Effet de la prostaglandine E <sub>2</sub> sur la génération d'AMP cyclique par les cellules épithéliales de la trachée de cobaye .....	41
Figure 8.	Effet des différentes prostaglandines naturelles sur la génération d'AMP cyclique par les cellules épithéliales de la trachée de cobaye .....	45
Figure 9.	Effet de la PGE <sub>2</sub> et de différents analogues sur la génération d'AMP cyclique par les cellules épithéliales de la trachée de cobaye .....	46
Figure 10.	Effet du AH23848B et du AH22921X sur la génération d'AMP cyclique induite par la PGE <sub>2</sub> sur les cellules épithéliales de la trachée de cobaye .....	49
Figure 11.	Effet du AH6809 sur la génération d'AMP cyclique induite par la PGE <sub>2</sub> .....	50
Figure 12.	Effet du AH23848B sur la production/sécrétion d'irET par les cellules épithéliales de la trachée de cobaye .....	51
Figure 13.	Effet du AH23848B sur l'inhibition de la production/secrétion d'irET induite par la PGE <sub>2</sub> .....	52
Figure 14.	Effet de l'adénosine sur la production/sécrétion d'irET par les cellules épithéliales de la trachée de cobaye en culture .....	54
Figure 15.	Effet de l'adénosine sur la génération d'AMP cyclique par les cellules épithéliales de la trachée de cobaye .....	55

Figure 16.	Effet de l'adénosine et des analogues de l'adénosine sur la génération d'AMP cyclique par les cellules épithéliales de la trachée de cobaye .....	59
Figure 17.	Effet des différents antagonistes des récepteurs à l'adénosine sur la génération d'AMP cyclique induite par le NECA .....	62
Figure 18.	Effet de puissants antagonistes du récepteur $A_{2B}$ sur l'inhibition de la production/sécrétion d'irET induite par l'adénosine .....	64
Figure 19.	Vérification d'un récepteur $A_{2A}$ sur l'épithélium de la trachée de cobaye en culture .....	66
Figure 20.	Vérification de la présence d'un récepteur $A_1$ sur l'épithélium de la trachée de cobaye en culture .....	67
Figure 21.	Effet de l'adénosine sur la production/sécrétion stimulée d'irET par les cellules épithéliales de la trachée de cobaye .....	69
Figure 22.	Corrélation entre la formation d'AMP cyclique et l'inhibition de la production/sécrétion d'irET par les cellules épithéliales de la trachée de cobaye .....	70

## LISTE DES TABLEAUX

<b>TABLEAU 1.</b>	Représentation synthèse des différents récepteurs des prostaglandines; le nom, la structure, le couplage, l'ordre de puissance des agonistes naturels, les agonistes sélectifs et les antagonistes sélectifs .....	11
<b>TABLEAU 2.</b>	Représentation synthèse des différents récepteurs à l'adénosine; le nom, la structure, le couplage, les agonistes et les antagonistes sélectifs .....	21
<b>TABLEAU 3.</b>	EC <sub>50</sub> et IC <sub>50</sub> de l'effet inhibiteur sur la production et la sécrétion d'ET-1 et la formation d'AMP cyclique de la prostaglandine E <sub>2</sub> ..	42
<b>TABLEAU 4.</b>	EC <sub>50</sub> et IC <sub>50</sub> de l'effet inhibiteur et stimulateur de l'adénosine sur la production et la sécrétion d'ET-1 et la formation d'AMP cyclique .....	56
<b>TABLEAU 5.</b>	Puissance et activité intrinsèque des différents analogues de l'adénosine sur les récepteurs A <sub>2B</sub> .....	60
<b>TABLEAU 6.</b>	Valeurs des pA <sub>2</sub> apparents des différents antagonistes sur les récepteurs A <sub>2B</sub> .....	63

## RÉSUMÉ

### CARACTÉRISATION DES EFFETS DE L'ADÉNOSINE ET DE LA PROSTAGLANDINE E<sub>2</sub> SUR LA GÉNÉRATION DE 3': 5'-ADÉNOSINE MONOPHOSPHATE CYCLIQUE ET SUR LA PRODUCTION/SÉCRÉTION DE L'ENDOTHÉLINE-1 PAR LES CELLULES ÉPITHÉLIALES DE LA TRACHÉE DE COBAYE.

Stéphane Pelletier

Mémoire présenté à la faculté de médecine  
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

Les fonctions de l'épithélium des voies respiratoires sont influencées par plusieurs médiateurs produits et libérés par ce même épithélium ou par d'autres populations cellulaires formant les voies pulmonaires. Parmi ces médiateurs, l'adénosine, la prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) et l'endothéline-1 (ET-1) agissent sur l'épithélium afin de modifier plusieurs fonctions physiologiques telles que le transport des ions chlorures et l'augmentation de la production de certains médiateurs. L'ET-1 est aussi reconnue comme étant, en partie, responsable de l'hypertension pulmonaire, de la contraction des muscles lisses vasculaires et de ceux des voies aériennes. Les rôles de l'ET-1 et de l'adénosine dans la pathophysiologie de l'asthme et de la fibrose kystique ont été suggérés par plusieurs groupes de recherche. À l'opposé, la PGE<sub>2</sub> semble être un agent "bronchoprotecteur" puisqu'elle est responsable de la relaxation des muscles lisses bronchiques et vasculaires. Le premier but de la présente étude était de déterminer les effets de l'adénosine et de la PGE<sub>2</sub> sur la production et la sécrétion de l'ET-1 par les cellules épithéliales de la trachée de cobaye. Le second but de cette étude a été de caractériser les récepteurs qui sont responsables des effets de la PGE<sub>2</sub> et de l'adénosine au niveau de l'épithélium des voies aériennes. Les niveaux d'ET-1 et la génération d'AMP cyclique ont été mesurés par RIA et par la détermination de la conversion de l<sup>[3H]</sup>-ATP en <sup>[3H]</sup>-AMP cyclique qui ont été préalablement séparées par chromatographie, respectivement. Nos résultats ont démontré que la PGE<sub>2</sub> et l'adénosine inhibent la production/sécrétion de l'ET-1 et stimulent la génération d'AMP cyclique en fonction des concentrations utilisées. De plus, une corrélation entre ces deux phénomènes est observée, suggérant ainsi l'implication de l'AMP cyclique dans le mécanisme de transduction impliqué dans ce phénomène. Puisqu'une telle corrélation existe entre ces deux événements, la caractérisation des récepteurs de l'adénosine et de la PGE<sub>2</sub> a été faite par la mesure de la génération d'AMP cyclique. Ainsi, nos résultats ont montré que la PGE<sub>2</sub> et l'adénosine stimulent la formation d'AMP cyclique via l'activation des récepteurs EP<sub>4</sub> et A<sub>2B</sub>, respectivement. De plus, la présence d'autres récepteurs à l'adénosine ou de la PGE<sub>2</sub> n'a pas été observée au niveau de l'épithélium de la trachée de cobaye. Nos résultats démontrent aussi que les effets de l'adénosine et de la PGE<sub>2</sub> sur la production/sécrétion d'ET-1 sont renversés par des antagonistes puissants des deux récepteurs préalablement caractérisés. Dans l'ensemble, la PGE<sub>2</sub> et l'adénosine semblent jouer un rôle dans la régulation de la production de l'ET-1 et influencent plusieurs fonctions physiologiques et pathophysiologiques de ce peptide.

## **INTRODUCTION**

### **1.1. CELLULES ÉPITHÉLIALES DES VOIES RESPIRATOIRES**

#### **1.1.1. Populations cellulaires**

L'épithélium des voies respiratoires se compose de quatre populations cellulaires qui sont les cellules de Clara, les cellules à mucus, les cellules ciliées et les cellules souches (basales, non différenciée). Les cellules de Clara sont des cellules sécrétrices de plusieurs médiateurs et elles possèdent une multitude de vésicules de sécrétion de petite taille. Les cellules à mucus, aussi appelées cellules à gobelets, sont responsables de la sécrétion du mucus au niveau des voies aériennes et possèdent une morphologie très caractéristique: elles ont de très grosses vésicules de sécrétion au niveau de la surface apicale. Les cellules ciliées sont, pour leur part, responsables du transport du mucus. Elles possèdent, comme leur nom l'indique, des cils à leur surface apicale. Enfin, les cellules basales sont les précurseurs des cellules de Clara, des cellules à gobelets et des cellules ciliées (St-George *et al.*, 1988).

#### **1.1.2. Fonctions**

Chacune des populations cellulaires des voies respiratoires possède des fonctions différentes et caractéristiques.

Les cellules basales semblent être à l'origine des autres cellules constituant l'épithélium des voies respiratoires. Inayama et al. (1988, 1989) ont démontré que l'inoculation de cellules basales à la surface luminale d'une trachée, préalablement dépourvue de son épithélium, permettait la régénération des cellules sécrétrices (Clara et à gobelets) et des cellules ciliées. De plus, les cellules basales servent d'ancrage pour les autres types cellulaires de l'épithélium (Evans & Plopper, 1988). Elles semblent être responsables de la fabrication d'une matrice extracellulaire essentielle à l'attachement des autres cellules. Mis à part leurs fonctions structurales et de précurseurs des cellules épithéliales, les cellules souches sont aussi responsables, en partie, de la protection du muscle lisse contre plusieurs neuropeptides puisqu'une activité d'endopeptidase a été localisée au niveau de ce type cellulaire (Nadel, 1991).

Les cellules ciliées ont peu de fonction connue. Jusqu'à présent, elles semblent seulement être responsables de la clairance du mucus au niveau des voies aériennes (Sleigh *et al.*, 1988). Selon nos connaissances, aucune autre fonction ne leur est encore attribuée.

Pour leur part, les cellules sécrétrices (cellules de Clara et à mucus) sont responsables de la sécrétion de mucus et de plusieurs médiateurs tels que certaines cytokines, les dérivés de l'acide arachidonique, le leucotriène B<sub>4</sub>, les prostaglandines E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub> majoritaire), F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) et D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>), le thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) (Wu *et al.*, 1992) et l'endothéline-1 (ET-1) (Black *et al.*, 1989; Yang *et al.*, 1997; Pelletier *et al.*, 1998). La libération d'oxyde nitrique par l'épithélium a été rapportée dans des cas

d'inflammation ou sous l'action de certaines cytokines (Robbins *et al.*, 1994; Robbins *et al.*, 1997).

Les rôles de ces médiateurs au niveau des voies respiratoires ont été étudiés principalement en rapport avec leurs effets sur le muscle lisse (Thein & Walters, 1995), mais leurs fonctions en rapport avec l'épithélium demeurent, à ce jour, peu définies.

### **1.1.3. Médiateurs influençant les fonctions de l'épithélium.**

Les différentes fonctions des cellules formant l'épithélium sont influencées par plusieurs autacoïdes et hormones.

La sécrétion de mucus par les cellules à mucus est stimulée par l'ATP (Kim *et al.*, 1989), la capsaïcine et certains neuropeptides (Kuo *et al.*, 1990) et, finalement, par le Platelet-Activating Factor (PAF) (Lellouch-Tubiana *et al.*, 1988).

Au niveau des cellules ciliées, les leucotriènes C<sub>4</sub> et D<sub>4</sub> (Wanner *et al.*, 1983), les prostaglandines E<sub>1</sub> et E<sub>2</sub> (Wanner *et al.*, 1983), la capsaïcine ainsi que certains neuropeptides (Lindberg & Mercke, 1986; Kondo *et al.*, 1990), les agonistes  $\beta_2$ -adrénergiques (Verdugo *et al.*, 1980), l'angiotensine II (Kobayashi *et al.*, 1990), l'endothéline-1 (Tamaoki *et al.*, 1991) et la bradykinine (Tamaoki *et al.*, 1989) sont des agents responsables de l'augmentation des battements ciliaires. À l'opposé, la Major-Basic-Protein (MBP) (Hastie *et al.*, 1987), l'éosinophile peroxydase (Motojima *et al.*, 1989) et l'adénosine (Tamaoki *et al.*, 1998) vont diminuer la fréquence des battements ciliaires.

Ces battements ne sont pas influencés uniquement par ces médiateurs, mais aussi par la viscosité (le contenu en eau) du mucus (Wanner, 1977; Welsh, 1987; Nadel, 1991). La viscosité du mucus est maintenue et influencée par le transport de l'ion chlorure. Par conséquent, les médiateurs contrôlant ce transport vont modifier la viscosité de ce mucus et probablement les battements ciliaires (Welsh, 1987). Le transport de cet ion est modulé par le Vasoactive-Intestinal-Peptide (VIP) (Nathanson *et al.*, 1983), l'acétylcholine (Marin *et al.*, 1976), l'histamine (Marin *et al.*, 1977), les prostaglandines (Al-Bazzaz *et al.*, 1981), les leucotriènes (Leikauf *et al.*, 1986), la MBP (Jacoby *et al.*, 1988), les neuropeptides (Al-Bazzaz *et al.*, 1985), le PAF (Tamaoki *et al.*, 1991) et l'endothéline (Plews *et al.*, 1991). La population cellulaire responsable du transport des ions chlorure demeure, quant à elle, encore inconnue.

Non seulement ces médiateurs ont-ils la capacité de moduler ces différentes fonctions de l'épithélium, mais quelques-uns d'entre eux sont aussi synthétisés au niveau de ce même épithélium. C'est le cas des dérivés de l'acide arachidonique, soit le leucotriène B<sub>4</sub>, les prostaglandines E<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>, F<sub>2α</sub> et le thromboxane A<sub>2</sub> (Wu *et al.*, 1992), et aussi de l'endothéline-1 (Black *et al.*, 1989). Le fait que ces médiateurs soient produits par l'épithélium suggère fortement une action autocrine et/ou paracrine de ceux-ci.



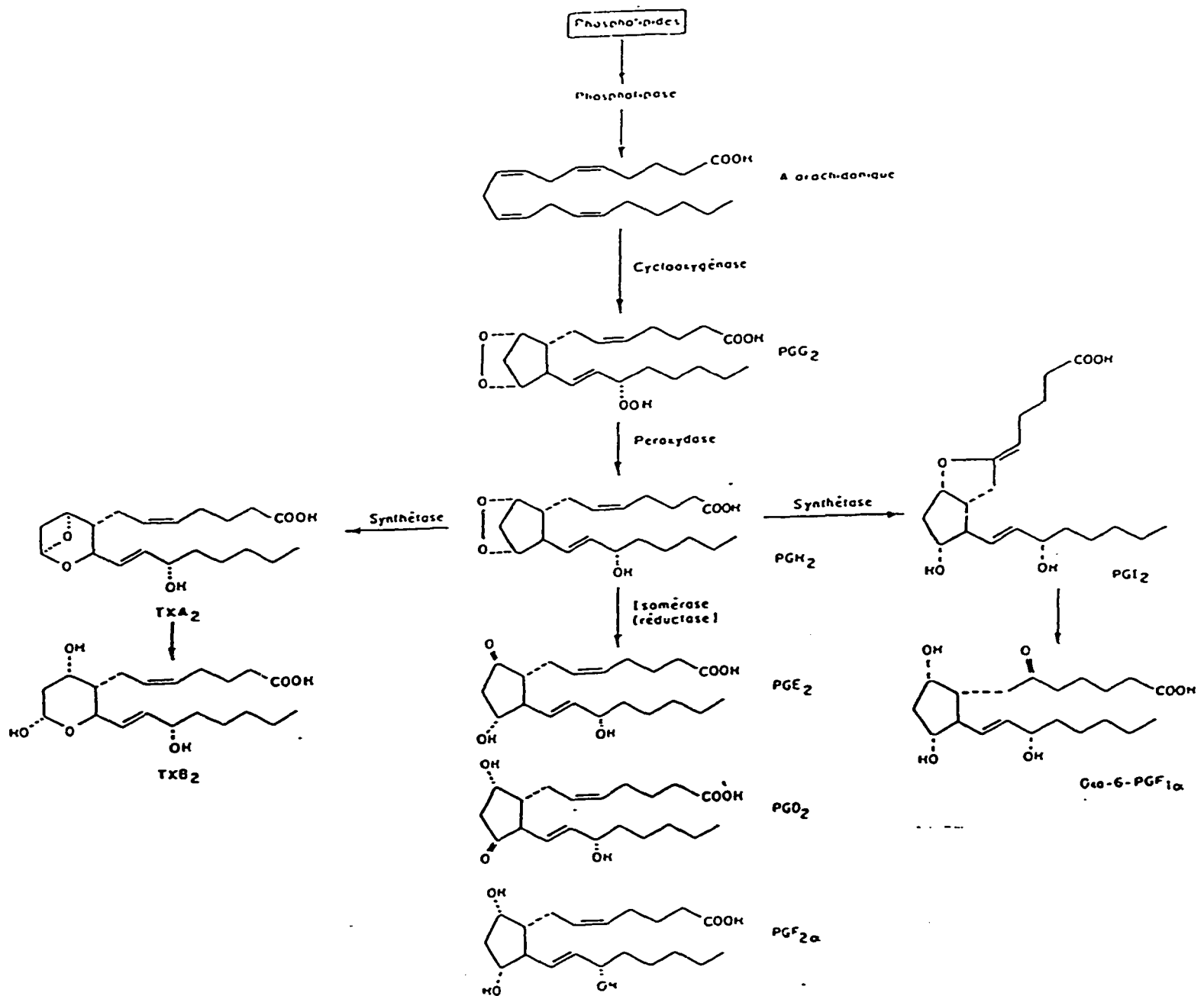


Figure 1. Voie de biosynthèse de prostaglandines.

## 1.2. LES PROSTAGLANDINES.

### 1.2.1. Voie de synthèse

Le précurseur des prostaglandines et du thromboxane  $A_2$  est l'acide arachidonique. Ce dernier est généré par la plupart des cellules à partir des phospholipides membranaires sous l'action de la phospholipase  $A_2$ . L'acide arachidonique est ensuite converti par la prostaglandine G/H synthétase (PGHS) en prostaglandine  $G_2$  (cyclooxygénation) et ensuite en prostaglandine  $H_2$  sous l'effet de l'activité peroxidase de l'enzyme (Hamberg & Samuelsson, 1967; Smith & Marnett, 1990). Il existe deux isoformes de cette enzyme, la PGHS-1 et la PGHS-2 (aussi nommées cyclooxygénase 1 et 2, COX-1 et COX-2), qui sont exprimées différemment. La première isoforme (constitutive) est normalement exprimée dans toutes les cellules et la seconde semble être exprimée lors de situations inflammatoires ou en réponse à des cytokines ou à des facteurs de croissance (Kujubu *et al.*, 1991; Hla & Neilson, 1992; O'Banion *et al.*, 1992; Herschman, 1994; Seibert *et al.*, 1994; Masferrer *et al.*, 1994). La prostaglandine  $H_2$  est le précurseur des différentes prostaglandines, du thromboxane et de la prostacycline ( $PGI_2$ ) qui sont obtenus par l'activité de différentes isomérases et synthases (Samuelsson *et al.*, 1975; Needleman *et al.*, 1986; Sigal, 1991) (figure 1).

La formation de ces médiateurs dépend de la distribution des enzymes responsables de la conversion de la prostaglandine  $H_2$ . Au niveau pulmonaire, la synthèse des prostaglandines est effectuée différemment selon le type cellulaire. La prostacycline

est principalement synthétisée par l'endothélium (Said, 1982), tandis que les prostaglandines  $E_2$ ,  $D_2$ ,  $F_{2\alpha}$  et le thromboxane  $A_2$  le sont par l'épithélium (Wu *et al.*, 1992). D'autres populations cellulaires pulmonaires, tels le macrophage alvéolaire, les fibroblastes et les pneumocytes de type II, sont aussi responsables de la synthèse des dérivés de l'acide arachidonique (Said, 1982).

### 1.2.2. Récepteurs et pharmacologie des récepteurs des prostaglandines

Les différentes prostaglandines produisent leurs fonctions par l'entremise d'une multitude de récepteurs situés à la surface des cellules cibles. Une première classification de ces récepteurs a été proposée par Kennedy *et al.*, (1982). Cette classification fut établie selon l'ordre de puissance des différents agonistes naturels sur les différents récepteurs, soit les récepteurs DP pour la  $PGD_2$ , EP pour la  $PGE_2$ , FP pour la  $PGF_{2\alpha}$ , IP pour la prostacycline ( $PGI_2$ ) et TP pour le thromboxane  $A_2$  (Tableau 1). Suite au développement d'agonistes et d'antagonistes sélectifs, une seconde classification de ces récepteurs a été proposée (Coleman *et al.*, 1994). Cette seconde classification est basée sur la première et conserve la structure proposée par Kennedy *et al.* (1982), soit les familles DP, EP, FP, IP et TP, mais en plus elle comporte une division de la famille des récepteurs EP en quatre sous-types soit les récepteurs  $EP_1$ ,  $EP_2$ ,  $EP_3$  et  $EP_4$  (Coleman *et al.*, 1994).

Au fil des années, la classification des différents récepteurs a été effectuée au moyen de diverses méthodes qui sont les essais fonctionnels, les essais de liaisons et les

études de voies de signalisation ou de seconds messagers. Comme cette dernière méthode sera celle utilisée pour la caractérisation du ou des récepteurs présents sur l'épithélium, nous avons volontairement omis de présenter les autres méthodes de caractérisation dans ce mémoire. Par ailleurs, afin de faciliter la compréhension de la classification des récepteurs, une synthèse des familles et des sous-types de récepteurs, de leur structure, de leur couplage et des outils pharmacologiques servant à les caractériser est présentée au tableau 1.

La première démonstration suggérant le couplage positif du récepteur DP à l'adénylyl cyclase a été rapportée par Simon et al. (1980). Dans cette étude, les prostaglandines  $E_2$ ,  $I_2$  et  $D_2$  stimulaient l'adénylyl cyclase avec la même puissance. Ceci a aussi été observé au niveau des cellules CCL44, confirmant ainsi l'existence d'un récepteur DP dans ces populations de cellules (Ito *et al.*, 1990). Le profil pharmacologique, ou l'ordre de puissance, des agonistes naturels sur ce récepteur est:  $PGD_2 \gg PGE_2 > PGF_{2\alpha} > PGI_2 = TXA_2$ . Il existe des outils pharmacologiques, trois agonistes et un seul antagoniste, servant à la caractérisation de ce récepteur et ils sont présentés au tableau 1.

Les récepteurs EP sont des protéines à sept domaines transmembranaires qui remplissent différentes fonctions, qui possèdent des profils pharmacologiques différents et qui peuvent être couplées à plusieurs protéines G régulatrices. Par contre, le profil pharmacologique des agonistes naturels de cette famille de récepteurs est le même, soit  $PGE_2 > PGF_{2\alpha}$ ,  $PGI_2 > PGD_2 = TXA_2$ , ce qui empêcha les premiers groupes de recherche

de les dissocier. Depuis, le développement d'agonistes et d'antagonistes sélectifs a permis de les distinguer.

Le premier récepteur de cette famille, le récepteur EP<sub>1</sub>, est un récepteur couplé à une protéine régulatrice de type G<sub>q</sub>. Cette caractérisation est la résultante d'études démontrant que les contractions de la trachée de cobaye induites par PGE<sub>2</sub> étaient indépendantes de la concentration de Ca<sup>2+</sup> extracellulaire (Creese & Denborough, 1981; Coleman & Kennedy, 1985). La caractérisation de ce type de récepteur est faite à l'aide d'agonistes sélectifs puisqu'aucun antagoniste sélectif n'a été développé à ce jour (Coleman *et al.*, 1994).

Le récepteur EP<sub>2</sub> est un récepteur couplé à une protéine régulatrice de type G<sub>s</sub> et plusieurs études ont permis d'arriver à cette conclusion. D'abord sur les entérocytes (Hardcastle *et al.*, 1982) et ensuite sur les cellules endothéliales de la cornée (Jumblatt & Peterson, 1991), le récepteur EP<sub>2</sub> a été relié à la stimulation de l'adénylyl cyclase. Une autre démonstration a été faite par Sonnenberg *et al.* (1990) qui a permis démontrer que les cellules RCCT en culture possèdent un seul site de liaison pour la prostaglandine E<sub>2</sub>. Une augmentation de la formation d'AMP cyclique a été observée lorsqu'elles étaient stimulées par cette prostaglandine. De plus, cette liaison de la PGE<sub>2</sub> est inhibée par la présence d'analogues de la guanosine, suggérant ainsi un couplage du récepteur à une protéine G (Sonnenburg *et al.*, 1990). Finalement, dans les cellules exprimant le récepteur EP<sub>2</sub> de souris, la PGE<sub>2</sub> stimule la formation d'AMP cyclique sans changement des niveaux d'IP<sub>3</sub> (Honda *et al.*, 1993). Comme pour le récepteur EP<sub>1</sub>, la caractérisation du récepteur

EP<sub>2</sub> se fait à l'aide d'agonistes sélectifs puisqu'aucun antagoniste sélectif n'a été développé (Gardiner, 1986; Nials *et al.*, 1993; Coleman *et al.*, 1994).

Des études de pharmacologie classique ont permis de montrer que le récepteur EP<sub>3</sub> pouvait se coupler à plusieurs protéines G régulatrices et conserver le même profil pharmacologique des antagonistes et des agonistes naturels ou synthétiques (Namba *et al.*, 1993). En utilisant des techniques de biologie moléculaire telles que le clonage d'ADN complémentaires à partir de librairie, il a été possible de mieux comprendre ce phénomène et de démontrer que ces différents couplages sont essentiellement dus à un épissage alternatif à l'extrémité 3' de l'ARN messenger encodant ces récepteurs, conférant ainsi des différences à l'extrémité C-terminal du récepteur (Irie *et al.*, 1993; Breyer *et al.*, 1994; Jon *et al.*, 1997). Ces variations au niveau de la queue cytoplasmique du récepteur engendrent différents couplages aux diverses protéines G (Negishi *et al.*, 1993). Néanmoins, il semble que le récepteur EP<sub>3</sub> soit principalement couplé à une protéine régulatrice de la famille des G<sub>i</sub>. Ceci ressort d'études dans lesquelles les effets produits par le récepteur EP<sub>3</sub> ont été inhibés par l'utilisation de la toxine pertussique (Sonnenburg & Smith, 1988; Sonnenburg *et al.*, 1990). Les outils pharmacologiques utilisés pour étudier ce récepteur sont essentiellement des agonistes puisqu'aucun antagoniste n'a été développé (Tableau 1).

Le dernier des sous-types de récepteurs de la famille EP est le récepteur EP<sub>4</sub>. Ce récepteur est couplé à une protéine régulatrice de la famille G<sub>s</sub> et, par conséquent, il est responsable de la stimulation de l'adénylyl cyclase et de la formation d'AMP cyclique (Nishigaki *et al.*, 1995; de Brum-Fernandes *et al.*, 1996; Murrat & Ashby, 1997). En

**TABLEAU 1. Représentation synthèse des différents récepteurs des prostaglandines; le nom, la structure, le couplage, l'ordre de puissance des agonistes naturels, les agonistes sélectifs et les antagonistes sélectifs.**

Nom	Structure	Couplage	Ordre de puissance	Agonistes sélectifs	Antagonistes Sélectifs
<b>DP</b>	7TM	G <sub>s</sub>	D >> E > F > I, T	BW245C ZK110841 RS93520	BWA868C
<b>FP</b>	7TM	G <sub>q/11</sub>	F > D > E > I, T	fluprostenol latanaprost	-
<b>IP</b>	7TM	G <sub>s</sub>	I >> D, E, F > T	cicaprost Iloprost	-
<b>TP</b>	7TM	G <sub>q/11</sub>	T = H >> D, E, F, I	U46619 STA <sub>2</sub> I-BOP	GR32191 SQ29548
<b>EP<sub>1</sub></b>	7TM	G <sub>q</sub>	E > F, I > D, T	Iloprost 17-phenyl- $\omega$ - trilor-PGE <sub>2</sub>	SC19220
<b>EP<sub>2</sub></b>	7TM	G <sub>s</sub>	E > F, I > D, T	Butaprost AH13205	-
<b>EP<sub>3</sub><sup>*</sup></b>	7TM	G <sub>q/11</sub> / G <sub>i/o</sub>	E > F, I > D, T	GR63799 sulprostone SC46275	-
<b>EP<sub>4</sub></b>	7TM	G <sub>s</sub>	E > F, I > D, T	-	AH23848B AH22921X

-Tiré de TIPS Receptor and Ion Channel Nomenclature Supplement, 1996 (Seventh edition).

-<sup>\*</sup> Il existe plusieurs isoformes de ce récepteur dû à un épissage alternatif résultant en différentes queues cytoplasmiques permettant le couplage de récepteur à différentes protéines G régulatrices (Namba *et al.*, 1993).

-D: PGD<sub>2</sub>

-E: PGE<sub>2</sub>

-F: PGF<sub>2</sub>

-I: PGI<sub>2</sub>

-T: TXA<sub>2</sub>

raison de sa découverte récente, peu d'outils pharmacologiques permettent sa caractérisation, mais l'utilisation de deux antagonistes sélectifs, le AH23848B et le AH22921X, a permis de le distinguer des autres récepteurs EP (Coleman *et al.*, 1994). De plus, en présence du butaprost, un agoniste sélectif EP<sub>2</sub>, ce récepteur semble incapable de stimuler l'adénylyl cyclase et de générer l'AMP cyclique (De Vries *et al.*, 1995; de Brum-Fernandes *et al.*, 1996).

La première indication que le récepteur FP est couplé à une protéine G<sub>q</sub> a été apportée par une étude de Raymond *et al.* (1983) démontrant que la PGF<sub>2α</sub> induit la formation d'IP<sub>3</sub> par les cellules lutéales. De plus, l'effet de la PGF<sub>2α</sub> sur la mobilisation de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire est associé à la formation d'IP<sub>3</sub> et ce phénomène est insensible à la toxine pertussique (Gusovsky, 1991; Nakao *et al.*, 1993; Quarles *et al.*, 1993). Un modèle utilisant le récepteur recombinant a aussi confirmé le couplage du récepteur FP à la formation d'IP<sub>3</sub> et l'augmentation de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire (Sugimoto *et al.*, 1992). L'ordre de puissance des agonistes naturels sur ce récepteur est PGF<sub>2α</sub> > PGD<sub>2</sub> > PGE<sub>2</sub> > PGI<sub>2</sub> = TXA<sub>2</sub>. Plusieurs agonistes synthétiques permettent la caractérisation de ce récepteur, mais aucun antagoniste n'a été, à ce jour, répertorié.

Le récepteur IP est lui aussi couplé à une protéine régulatrice de type G<sub>i</sub> puisque son activation résulte en une augmentation de la génération d'AMP cyclique dans différents modèles (Siegl *et al.*, 1979; Hashimoto *et al.*, 1990; Ito *et al.*, 1992). L'ordre de puissance des agonistes naturels est PGI<sub>2</sub> >> PGD<sub>2</sub> = PGE<sub>2</sub> = PGF<sub>2α</sub> > TXA<sub>2</sub>. L'iloprost et le cicaprost sont de très bon agonistes sur ce récepteur, mais l'iloprost



manque de sélectivité puisqu'il agit aussi sur le récepteur EP<sub>1</sub>. De plus, il n'existe aucun antagoniste permettant d'inhiber les actions médiées par ce récepteur.

Enfin, le récepteur TP est couplé à une protéine régulatrice G<sub>q</sub>. Dans les plaquettes, l'effet de l'agoniste sélectif TP, U46619, n'est pas inhibé par la toxine pertussique et mène à l'activation de la phospholipase C (PLC) (Brass *et al.*, 1987). De plus, l'utilisation d'anticorps spécifiques contre les protéines G de la famille G<sub>q</sub> inhibe l'activité du U46619 (Shenker *et al.*, 1991). Finalement, la purification de ce récepteur par chromatographie d'affinité montre qu'il est couplé à deux types de protéines G, dont une de la famille des G<sub>q</sub> (Knezevic *et al.*, 1993).

### **1.2.3. Fonctions des prostaglandines au niveau des voies aériennes**

De façon générale, une connaissance de la distribution des récepteurs permet de mieux comprendre les fonctions de certains médiateurs sur les plans physiologique et pathophysiologique. Cependant, la distribution des récepteurs aux prostaglandines au niveau des voies aériennes est encore bien peu connue. Les récepteurs DP sont retrouvés au niveau des muscles lisses des voies aériennes et sont responsables de leur relaxation (Coleman *et al.*, 1990). Quant aux récepteurs de la famille EP, l'activation du récepteur EP<sub>1</sub> induit la contraction des muscles lisses trachéaux chez le cobaye (Coleman *et al.*, 1994). Le récepteur EP<sub>2</sub> est présent sur les macrophages alvéolaires et les muscles lisses. Lorsque activé, il inhibe la relâche de médiateurs contractiles et cause la relaxation (Coleman *et al.*, 1990). En ce qui a trait au récepteur EP<sub>3</sub>, l'ARN messager de ce type de

récepteur a été retrouvé au niveau du poumon, mais aucune fonction ne lui a encore été attribuée (Sugimoto *et al.*, 1998). Par contre, le ou les isoformes du récepteur EP<sub>3</sub> n'ont pas été identifiées. De découverte récente, le récepteur EP<sub>4</sub> a été localisé au niveau de la trachée de rat (Lydford & McKechnie, 1993). La présence de récepteurs FP au niveau des voies aériennes a été rapportée par Coleman *et al.*, (1987). Ils y induisent la contraction des muscles lisses. Le récepteur IP ne semble pas être présent au niveau des voies aériennes puisque l'Iloprost, un analogue stable de la prostacycline, n'y produit aucun effet (Thein & Walters, 1995). Ce récepteur serait plutôt situé au niveau de l'endothélium des vaisseaux sanguins pulmonaires et serait, en partie, responsable de leur vasodilatation (Thein & Walters, 1995). Enfin, le récepteur TP est présent au niveau des muscles lisses trachéaux, des muscles lisses vasculaires et de l'endothélium, tout comme le récepteur IP, mais il y induit la contraction des muscles lisses (Namba *et al.*, 1998).

### **1.3. L'ADÉNOSINE**

#### **1.3.1. Voie de synthèse**

Chez l'homme comme chez plusieurs autres espèces animales, l'adénosine est l'un des produits intermédiaires de la dégradation de l'AMP vers l'acide urique qui est destinée à l'excrétion. Ainsi, la voie de synthèse de l'adénosine correspond à une des voies de l'élimination de l'AMP et autres nucléotides de purines (Figure 2). L'adénosine est produite par l'action de la 5'-nucléotidase qui hydrolyse l'AMP et libère ainsi le

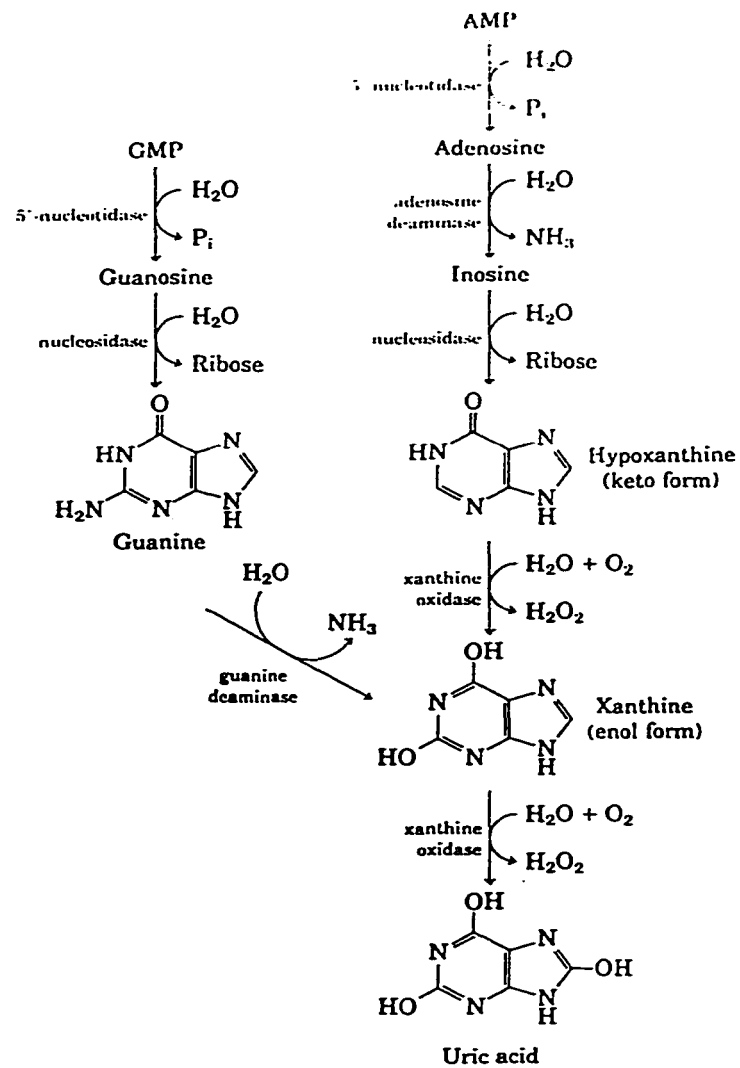


Figure 2. Voie de biosynthèse de l'adénosine.

groupement phosphate en position 5' de la molécule. Au niveau des voies aériennes, la source d'adénosine n'est pas encore clairement identifiée (Polosa & Holgate, 1997). Certaines études ont démontré que, chez des animaux sensibilisés, l'adénosine pouvait être libérée par les mastocytes suite à une provocation (*challenge* immunologique) (Marquardt *et al.*, 1984). D'autres études ont aussi proposé que l'adénosine pourrait être libérée par les plaquettes et les neutrophiles puisque la stimulation de ces dernières libère l'ADP et l'AMP. Ceux-ci peuvent alors être convertis en adénosine par l'action de 5'-nucléotidases spécifiques (Polosa & Holgate, 1997; Madara *et al.*, 1998). Une autre source d'adénosine pourrait être l'endommagement de l'épithélium puisque de grandes quantités de nucléotides ont été retrouvées dans le cytoplasme de ces cellules et peuvent ensuite être converties en adénosine par l'action de nucléotidases spécifiques (Gordon, 1986).

### 1.3.2. Récepteurs de l'adénosine

L'adénosine produit ses effets via l'activation d'une famille de récepteurs nommée P<sub>1</sub>-purinorécepteurs ou récepteurs de l'adénosine. Cette famille de récepteurs se divise en quatre sous-types soit les récepteurs A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub>, et A<sub>3</sub> (Revue par (Fredholm *et al.*, 1994). Toutes ces formes de récepteurs sont du type *Rhodopsin-like* et sont couplées à différentes protéines G régulatrices (Revue par (Fredholm *et al.*, 1994).

Le récepteur A<sub>1</sub> est un récepteur couplé aux protéines régulatrices G<sub>i-1</sub>, G<sub>i-2</sub>, G<sub>i-3</sub> et G<sub>o</sub> et ne semble pas être couplé aux protéines G de type G<sub>s</sub> et G<sub>z</sub> (Freissmuth *et al.*,

1991; Munshi *et al.*, 1991). De façon générale, ce type de récepteur est sensible à la toxine pertussique confirmant ainsi l'implication de protéines  $G_i/G_o$ . De plus, l'activation de ce type de récepteur induit une grande variété de phénomènes cellulaires, telles l'inhibition de l'adénylyl cyclase (Van Calcar *et al.*, 1978; Londos *et al.*, 1980a), l'inhibition de la conductance  $Ca^{2+}$  dépendante (Trussel & Jackson, 1985), la stimulation de la phospholipase C, la génération de calcium et l'activation de la protéine kinase C (Gerwins & Fredholm, 1992; Gerwins & Fredholm, 1994). D'autres effets, comme l'inhibition de l'hydrolyse des inositols phosphates, ont aussi été rapportés (Kendall & Hill, 1988; Delahunty & Linden, 1988). Sur la base d'observations faites sur d'autres récepteurs couplés aux protéines G, il est permis de croire que certains effets soient induits par la sous unité  $\alpha$  et d'autres par les sous unités  $\beta, \gamma$  de la protéine G impliquée (Birnbaumer, 1992).

Les récepteurs  $A_2$  ( $A_{2A}$  et  $A_{2B}$ ) sont des récepteurs couplés à une protéine régulatrice de type  $G_s$  puisqu'ils induisent l'activation de l'adénylyl cyclase (Londos *et al.*, 1980b). À l'origine, seul le terme  $A_2$  était utilisé pour nommer tous les récepteurs de l'adénosine induisant l'activation de l'adénylyl cyclase (Londos *et al.*, 1980b). La division de cette classe de récepteurs en deux sous-types,  $A_{2A}$  et  $A_{2B}$ , fut proposée par Daly *et al.* (1983) (Daly *et al.*, 1983). Leur étude suggère la présence de récepteurs de haute affinité activant l'adénylyl cyclase dans l'oreillette de rat et un récepteur de faible affinité dans tout le reste du cerveau. Des résultats semblables ont aussi été obtenus par Elfman *et al.* (1984) (Elfman *et al.*, 1984) qui montrent des récepteurs de haute affinité dans les neuroblastomes en culture et des récepteurs de faible affinité dans les cellules gliales.

Ainsi, les noms  $A_{2A}$  et  $A_{2B}$  ont été officiellement donnés à ces récepteurs de haute et de faible affinités, respectivement (Bruns *et al.*, 1986). Mis à part la stimulation de la production d'AMP cyclique, le récepteur  $A_{2B}$  semble influencer de façon positive les niveaux de calcium intracellulaire via un mécanisme requérant une augmentation de la concentration de  $Ca^{2+}$  intracellulaire initiale, et qui est sensible à la toxine cholérique (Feoktistov *et al.*, 1994). Par contre, ce phénomène ne semble pas avoir été observé par l'activation du récepteur  $A_{2A}$  (Feoktistov & Biaggioni, 1997).

La présence d'un autre récepteur à l'adénosine fut rapportée dans les années 90, soit le récepteur  $A_3$  (Maenhaut *et al.*, 1990; Libert *et al.*, 1991; Zhou *et al.*, 1992; Pierce *et al.*, 1992; Rivkees & Reppert, 1998). Il s'agit d'un récepteur couplé à une protéine régulatrice de type  $G_i$ , puisque son activation induit l'inhibition de l'adénylyl cyclase (Maenhaut *et al.*, 1990; Libert *et al.*, 1991; Zhou *et al.*, 1992; Pierce *et al.*, 1992; Rivkees & Reppert, 1998). Par contre, due à sa découverte récente, une évaluation exhaustive des fonctions de ce type de récepteur n'a pu être faite à ce jour.

### **1.3.3. Pharmacologie des récepteurs à l'adénosine.**

Des agonistes et antagonistes puissants et sélectifs ont été développés pour trois des quatre formes de récepteurs, soit les récepteurs  $A_1$ ,  $A_{2A}$  et  $A_3$ . Il sont présentés au tableau 2. Le profil pharmacologique de ces différents outils est connu et accepté. Pour cette raison, une description exhaustive du profil pharmacologique de ces différents

agents ne sera pas présentée dans ce mémoire. Lorsque nécessaire, ou à des fins de comparaison, il en sera parfois fait mention.

Concernant le récepteur  $A_{2B}$ , il n'existe pas encore d'agonistes et d'antagonistes puissants et sélectifs qui lui sont propres. Néanmoins, la caractérisation de ce type de récepteur peut se faire par une méthode d'exclusion, i.e. par le constat de l'inefficacité ou de la faible affinité d'agonistes ou d'antagonistes sélectifs propres aux autres types de récepteurs à l'adénosine (Pierce *et al.*, 1992).

Tel que mentionné précédemment, les récepteurs  $A_{2A}$  et  $A_{2B}$  sont couplés de façon positive à l'adénylyl cyclase et sont activés par le NECA, un agoniste non sélectif sur les récepteurs  $A_{2A}$  et  $A_{2B}$  (Jarvis *et al.*, 1989; Nakane & Chiba, 1990). À l'opposé, l'agoniste sélectif  $A_{2A}$ , le CGS21680, est un excellent outil pour discriminer les effets médiés par les récepteurs  $A_2$  puisqu'il est inactif sur le récepteur  $A_{2B}$  (Alexander *et al.*, 1996; Jarvis *et al.*, 1989; Nakane & Chiba, 1990; Casadó *et al.*, 1992; Peakman & Hill, 1994; Brackett & Daly, 1994; Fiebich *et al.*, 1996). De plus, les  $EC_{50}$  de ces différents agonistes sur les deux types de récepteurs sont très différents. Sur le récepteur  $A_{2B}$ , le NECA possède un  $EC_{50}$  dans la région des bas micromolaires (1-10 $\mu$ M) tandis que le CGS21680 est quasi totalement inefficace (Feoktistov & Biaggioni, 1993; Brackett & Daly, 1994; Feoktistov & Biaggioni, 1995; Alexander *et al.*, 1996; Fiebich *et al.*, 1996; Cooper *et al.*, 1997). Sur le récepteur  $A_{2A}$ , le CGS21680 et le NECA ont des  $EC_{50}$  comparables et se situent dans les bas nanomolaires (1-10nM) (Jarvis *et al.*, 1989; Nakane & Chiba, 1990; Casadó *et al.*, 1992; Hide *et al.*, 1992; Brackett & Daly, 1994; Feoktistov & Biaggioni, 1995; Fiebich *et al.*, 1996; Dubey *et al.*, 1996; Feoktistov &

Biaggioni, 1995). Ainsi, les effets observés lors de la stimulation avec le NECA, à des concentrations de l'ordre du bas micromolaire (1-10  $\mu$ M), et l'absence d'effet sous l'action de l'agoniste sélectif  $A_{2A}$ , le CGS21680, constituent des caractéristiques du récepteur  $A_{2B}$ . De plus, l'agoniste naturel et non-sélectif, l'adénosine, et le 2-Cl-Adénosine (2CADO) possèdent de faibles affinités (10-100  $\mu$ M) sur ce type de récepteur, contrairement à leurs affinités envers les autres types de récepteurs (Hernandez *et al.*, 1993; Peakman & Hill, 1994; Alexander *et al.*, 1994b; Alexander *et al.*, 1996; Cooper *et al.*, 1997). L'ordre de puissance caractéristique de ces quatre agonistes sur le récepteur  $A_{2B}$  est : NECA > 2CADO  $\geq$  adénosine  $\ggg$  CGS21680 (Hernandez *et al.*, 1993; Alexander *et al.*, 1994b; Alexander *et al.*, 1996; Cooper *et al.*, 1997).

La caractérisation de récepteurs en fonction du degré d'affinité apparente des différents agonistes sur ceux-ci n'est pas idéale. En effet, cette affinité apparente ne dépend pas uniquement de la liaison du ligand (l'agoniste), mais elle est aussi influencée par les différents facteurs impliqués dans les mécanismes de signalisation intracellulaire. L'utilisation d'antagonistes sélectifs et puissants est donc préférable puisque leur liaison au récepteur ne dépend pas de ces mécanismes intracellulaires (Kenakin, 1987). Cependant, tel qu'observé au tableau 2, il n'existe aucun antagoniste hautement sélectif et puissant pour le récepteur  $A_{2B}$ , contrairement aux autres types de récepteurs à l'adénosine.

L'étude de la relation de structure-activité des antagonistes de l'adénosine sur le récepteur  $A_{2B}$  est relativement bien complétée (Hernandez *et al.*, 1993; Alexander *et al.*, 1994b; Alexander *et al.*, 1996; Cooper *et al.*, 1997). Il semble que certains dérivés xanthines, comme le XAC (xanthine amine congener), soient aussi puissants sur le



**TABLEAU 2. Représentation synthèse des différents récepteurs à l'adénosine; le nom, la structure, le couplage, les agonistes et les antagonistes sélectifs.**

Nom	Structure	Couplage	Agonistes sélectifs	Antagonistes Sélectifs
A <sub>1</sub>	7TM	G <sub>1/0</sub>	N <sup>6</sup> -cyclopentyladenosine (CPA) 2-Cl-CPA (CCPA) GR79236	DPCPX
A <sub>2A</sub>	7TM	G <sub>s</sub>	CGS21680 DPMA PAPA-APEC	ZM241385 SCH58261 KF17837 8-(3-chlostyryl)caffeine
A <sub>2B</sub>	7TM	G <sub>s</sub>	-	3-n-propylxanthine <sup>†</sup>
A <sub>3</sub>	7TM	G <sub>i/0</sub>	IB-MECA 2-Cl-IB-MECA	I-ABOPX

Tiré de: TiPS Receptor and Ion Channel Nomenclature Supplement, 1996 (Seventh edition).

<sup>†</sup> Feoktistov, I. and Biaggioni, I. Adenosine A<sub>2B</sub> receptors evoke Interleukin-8 secretion in human mast cells. An emproflyline-sensitive mechanism with implication for asthma. *J. Clin. Invest.* (1995) **96**:1979-1986.

récepteur  $A_{2B}$  que sur les autres types de récepteurs, à l'exception du récepteur  $A_3$  (Feoktistov & Biaggioni, 1993; Fredholm *et al.*, 1994; Brackett & Daly, 1994; Alexander *et al.*, 1996; Cooper *et al.*, 1997). Les valeurs de  $pA_2$  de cet antagoniste se situent aux alentours de 9 pour le récepteur  $A_1$ , entre 7 et 8 pour les récepteurs  $A_{2A}$  et  $A_{2B}$  et sont quasi inefficaces ( $> 100 \mu M$ ) sur le récepteur  $A_3$  (Fredholm *et al.*, 1994). Le CGS 15943, un antagoniste non sélectif  $A_{2A}$ - $A_{2B}$  ( $pA_2 = 7-8$ ), permet aussi de différencier les effets transmis par les récepteurs  $A_{2A}$  et  $A_{2B}$  des autres types, soit les récepteurs  $A_1$  et  $A_3$ , puisqu'il possède un plus faible  $pA_2$  pour le récepteur  $A_1$  (7-8) (Fredholm *et al.*, 1994; Alexander *et al.*, 1996; Cooper *et al.*, 1997). Cependant la relation de structure-activité de cet antagoniste sur le récepteur  $A_3$  n'a pas, à notre connaissance, été effectuée (Fredholm *et al.*, 1994). Les antagonistes sélectifs  $A_1$  et  $A_{2A}$ , soit le DPCPX ( $pA_2 = 9$ , (Fredholm *et al.*, 1994)) et le ZM241385 ( $pA_2 = 9$ , (Poucher *et al.*, 1995)), possèdent de faibles affinités sur le récepteur  $A_{2B}$  ( $pA_2 = 7$  pour le ZM241385 (Poucher *et al.*, 1995) et  $pA_2 = 7$  pour le DPCPX (Hernandez *et al.*, 1993; Alexander *et al.*, 1994b; Alexander *et al.*, 1996; Cooper *et al.*, 1997)), comparativement à leur affinité sur les récepteurs  $A_1$  et  $A_{2A}$ , respectivement. Le composé antiasthmatique enprofylline (3-n-propylxanthine) est l'antagoniste le plus sélectif du récepteur  $A_{2B}$  connu à ce jour (Feoktistov & Biaggioni, 1997). L'enprofylline est 22 fois plus sélective pour le récepteur  $A_{2B}$  et 5 fois plus sélective pour le récepteur  $A_{2A}$ , comparativement au récepteur  $A_1$  (Robeva *et al.*, 1996). À l'égard du récepteur  $A_3$ , l'enprofylline semble posséder une très faible affinité (Linden *et al.*, 1993). Elle demeure peu efficace puisqu'elle possède un  $IC_{50}$  de 10-100  $\mu M$  (Feoktistov & Biaggioni, 1995; Alexander *et al.*, 1996; Robeva *et al.*, 1996; Cooper *et*

*al.*, 1997). La méthode d'exclusion s'applique aussi pour les antagonistes sélectifs des autres types de récepteurs à l'adénosine afin de discriminer les effets produits par ces différents récepteurs. Ainsi, les antagonistes sélectifs des récepteurs  $A_1$ ,  $A_{2B}$  et  $A_3$  à l'adénosine seront peu ou pas efficaces sur le récepteur  $A_{2B}$ .

#### **1.3.4. Fonctions de l'adénosine au niveau des voies respiratoires.**

Les fonctions de l'adénosine au niveau des voies aériennes, et plus particulièrement au niveau de l'épithélium, demeurent encore bien peu définies. Comme mentionné dans la première partie de cette introduction, l'adénosine semble être impliquée dans la modulation du transport des ions  $Cl^-$ , de la sécrétion du mucus et du battement ciliaire (Lazarowski *et al.*, 1992; Tamaoki *et al.*, 1998). L'adénosine semble aussi être étroitement impliquée dans l'asthme (Polosa & Holgate, 1997; Feoktistov *et al.*, 1998). Elle peut aussi augmenter la pression sanguine pulmonaire et l'extravasation plasmatique, entraînant ainsi l'oedème pulmonaire (Watt *et al.*, 1987). De plus, l'adénosine joue un rôle dans le chimiotactisme des neutrophiles via l'activation des mastocytes et stimule les basophiles circulants à libérer de l'histamine (Church *et al.*, 1983; Hughes *et al.*, 1984; Peachell *et al.*, 1988). Le rôle chemo-attractant de l'adénosine a été partiellement expliqué par les travaux de Feoktistov *et al.* (1995) qui ont récemment montré que l'activation des mastocytes humains par l'adénosine conduisait à la libération d'IL-8, un agent chemo-attractant (Feoktistov & Biaggioni, 1995), faisant ainsi un lien entre l'adénosine et l'asthme. Le rôle néfaste de l'adénosine au niveau des voies respiratoires a

aussi été rapporté par d'autres groupes de recherche. De plus, de récentes études ont démontré que l'adénosine était responsable de bronchoconstriction via l'activation du récepteur A<sub>1</sub> (Nyce & Metzger, 1997; Ali *et al.*, 1997).

## 1.4. LES ENDOTHÉLINES

### 1.4.1. Voie de synthèse

L'endothéline-1 (ET-1) est un peptide de 21 acides aminés qui a été découvert à la fin de la dernière décennie (Yanagisawa *et al.*, 1988). L'ET-1 contient deux ponts disulfures reliant les acides aminés de la position 1 à la position 15 et ceux de la position 3 à la position 11. Trois gènes distincts ont été, jusqu'à présent, découverts et encodent trois formes d'endothélines, soit l'endothéline-1, -2, et -3 (Yanagisawa *et al.*, 1998) (Figure 3). Les endothélines sont exprimées de façon constitutive dans plusieurs types cellulaires dont les cellules épithéliales de la trachée (Black *et al.*, 1989; Laporte *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1997). L'ET-1 étant la seule forme d'endothéline retrouvée au niveau des cellules épithéliales de la trachée de cobaye (Yang *et al.*, 1997), seule cette isoforme sera considérée dans ce mémoire.

La biosynthèse de l'ET-1 nécessite le clivage du précurseur pré-pro ET-1 en un second précurseur, la pré-ET-1 (ou la big-ET-1) (Yanagisawa *et al.*, 1998). Ces coupures sont effectuées par l'action d'endopeptidases, telles que la furine (Denault *et al.*, 1995), et par l'action de carboxypeptidases. La big-ET-1 est un peptide de 38 acides aminés qui est,

à son tour, coupé par l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE) afin de produire l'ET-1 (Yanagisawa *et al.*, 1988) (Figure 4).

Comme les cellules endothéliales ne possèdent pas de granules de sécrétion, il est donc improbable que l'ET-1 y soit emmagasinée. Le groupe de Yanagisawa *et al.* (1988) a donc proposé que les agents affectant la synthèse de l'ET-1 agissent au niveau transcriptionnel ou post-traductionnel. Cette hypothèse a été confirmée par une étude du groupe de Prins *et al.* (1994) qui ont montré que la prostaglandine E<sub>2</sub> et la prostacycline inhibent la production et la sécrétion d'ET-1, en diminuant la transcription du gène via un mécanisme dépendant du GMP cyclique et de la protéine kinase dépendante du GMP cyclique (PKG).

#### **1.4.2. Fonctions de l'ET-1 au niveau des voies aériennes**

Les effets vasoconstricteurs de ET-1 sont bien connus (Yanagisawa *et al.*, 1988). Cependant, elle possède aussi des activités broncho- et trachéo-constrictrices (Boichot *et al.*, 1991; Inui *et al.*, 1994; Patel *et al.*, 1997). L'effet de l'ET-1 sur le muscle lisse ne se limite pas à sa simple contraction, elle en stimule aussi la prolifération (Noveral *et al.*, 1992; Glassberg *et al.*, 1994). Au niveau de l'épithélium, l'ET-1 semble impliquée dans la modulation des battements ciliaires (Tamaoki *et al.*, 1991) et du transport des ions chlorure (Plews *et al.*, 1991; Satoh *et al.*, 1992). La libération de certains médiateurs est aussi influencée par l'ET-1, autant au niveau de l'épithélium qu'à celui des macrophages alvéolaires. Sous l'action de l'ET-1, le macrophage alvéolaire augmente sa production

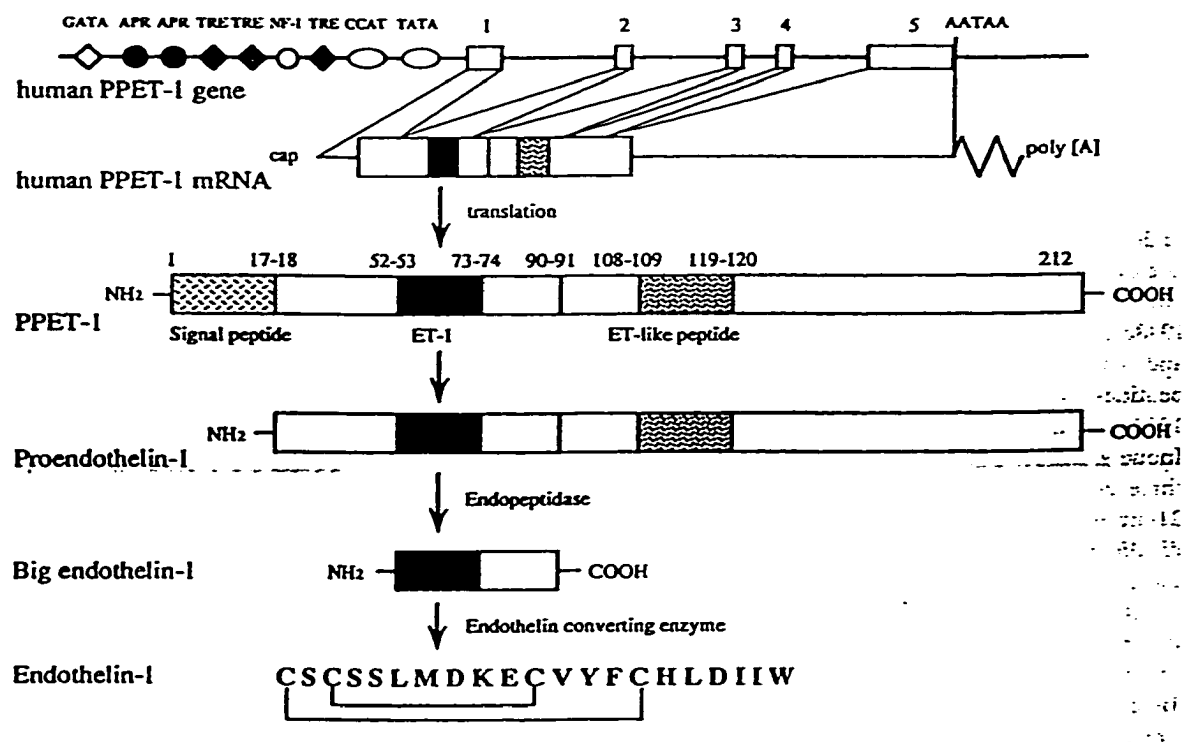


Figure 4. Voie de synthèse de l'endothéline-1

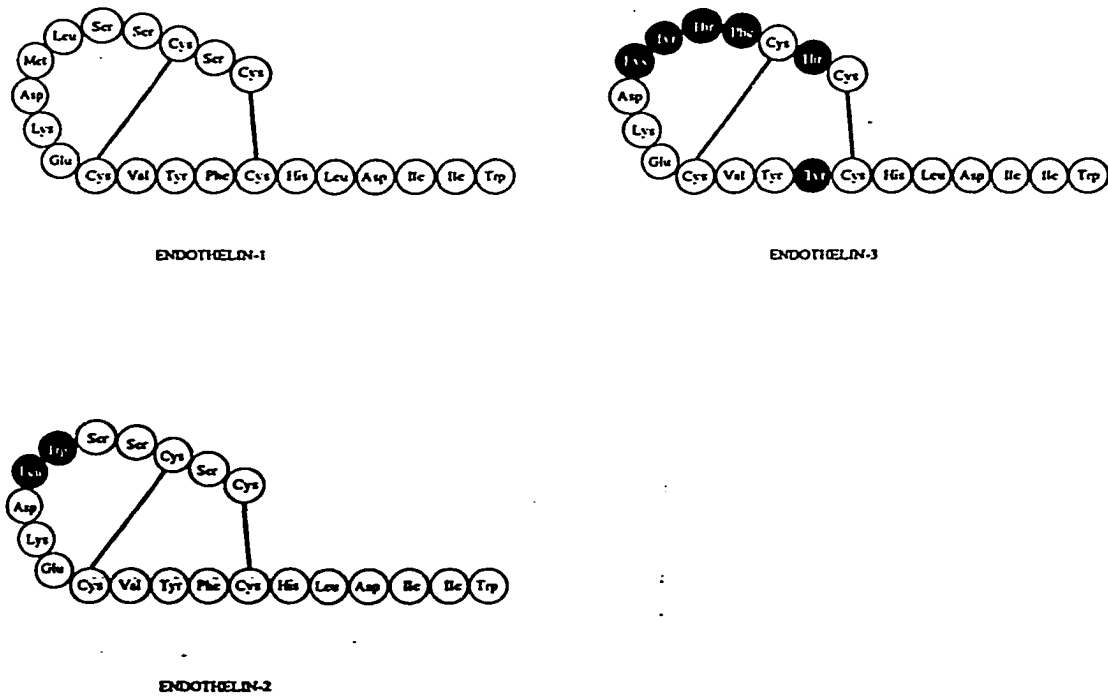


Figure 3. Isoformes des endothélines.

d'eicosanoïdes (Millul *et al.*, 1991) et sa production de superoxides (Haller *et al.*, 1991) et l'épithélium augmente sa production de certaines prostaglandines comme la PGE<sub>2</sub>, la PGD<sub>2</sub>, le thromboxane A<sub>2</sub> et un autre dérivé de l'acide arachidonique, le 12-HETE (Wu *et al.*, 1992).

### **1.5. BUTS DE L'ÉTUDE**

L'ET-1 et l'adénosine sont deux médiateurs impliqué dans l'asthme. À l'inverse, la PGE<sub>2</sub> exerce des actions broncho- et trachéo-protectrices. L'objet de la présente étude est la détermination de l'action de la PGE<sub>2</sub> et de l'adénosine sur la production/sécrétion de l'ET-1. Elle vise aussi la caractérisation des récepteurs à l'adénosine et aux prostaglandines impliqués qui sont présents sur l'épithélium des voies aériennes.



## **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

### **2.1. DISSECTION DES TRACHÉES DE COBAYES.**

Les trachées sont obtenues de cobayes (Dunkin-Hartley guinea-pig) achetés des laboratoires Charles River (St-Constant, Qué.). Les animaux (sans préférence de sexe) sont sacrifiés par dislocation cervicale et ensuite exsanguinés par la coupure de la veine cave inférieure en accord avec le guide Canadien sur la santé des animaux. La trachée est alors disséquée et mise dans une solution physiologique stérile de Krebs-Heinseleit.

### **2.2. ISOLATION DES CELLULES ÉPITHÉLIALES DES TRACHÉES DE COBAYES.**

Les trachées des cobayes sont nettoyées sous des conditions stériles. Les cellules épithéliales sont obtenues suite à l'incubation d'une heure, à 37°C, des trachées contenant une solution de protéase bactérienne de type XXIV (0,1%). Par la suite, les cellules épithéliales sont retirées mécaniquement, à l'aide d'un policeman, et suspendues dans le milieu de culture DMEM-F12 contenant de la pénicilline (100UI/ml), de la streptomycine (100U/ml) et de la fungizone (2 µg/ml). Les cellules sont ensuite centrifugées afin de retirer la protéase et ensuite suspendues à nouveau dans un milieu de culture DMEM-F12 (pénicilline., streptomycine, fungizone) contenant du sérum bovin foetal (FBS) et mises

en culture pour 48 heures. Suite à ces 48 heures d'incubation, le milieu de culture est changé pour un milieu frais contenant du FBS et les antibiotiques durant 24 heures. Les cellules sont ensuite cultivées dans un milieu sans sérum pour les dernières 48 heures. Cette méthode permet l'isolation des quatre populations cellulaires formant l'épithélium des voies aériennes, soit les cellules de Clara, à gobelets, ciliées et basales (Prié et al., 1997). Dépendant des types d'expériences effectuées, les cellules sont mises en culture dans des plaques de cultures de 6 ou 24 puits à raison de  $1,5 \times 10^6$  et  $5 \times 10^5$  cellules par puits respectivement.

## **2.3. PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES**

### **2.3.1. Sécrétion d'ET-1**

Suite aux cinq jours de culture primaire, le milieu de culture est à nouveau changé et remplacé par un milieu frais contenant les concentrations appropriées des substances pharmacologiques, s'il y a lieu. Les cellules sont ensuite incubées à 37°C, dans un environnement humidifié contenant 5% de CO<sub>2</sub>, durant 1, 3, 6, et 24 heures pour la cinétique et 24 heures pour les essais subséquents. Les antagonistes ou inhibiteurs sont ajoutés au milieu d'incubation 30 minutes avant la stimulation par les agonistes. Suite à ces temps d'incubation, les milieux de culture sont retirés et conservés à -20°C avant le dosage de l'ET-1 par RIA (section 2.4.1.). Les cellules sont alors mises en présence de 0,5 ml de Triton X-100 (0,1%) et incubées 24 heures à 4°C et le dosage des protéines

totales se fait selon la méthode de Bradford (section 2.4.3.). Suite à l'incubation de 24 heures en présence de Triton X-100 (0,1%), les plaques de culture sont mises à -20°C en attente du dosage des protéines totales.

### **2.3.2. Formation d'AMP cyclique**

Suite aux cinq jours de culture primaire, les milieux de culture sont changés et du milieu frais contenant de l'['<sup>3</sup>H]-adénine (2μCi) est ajouté et les cellules sont à nouveau incubées 2 heures à 37°C afin que l'['<sup>3</sup>H]-adénine soit incorporée et métabolisée en [<sup>3</sup>H] ATP. Les cellules sont ensuite lavées deux fois avec une solution d'HBS-glucose (Hanks buffer solution, 130mM NaCl, 3.5 mM KCl, 2.3 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.98 mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM Hepes, 0.5mM EGTA et 10 mM de glucose) et ensuite mises en présence d'une solution d'HBS-BSA (Hanks buffer solution, 130mM NaCl, 3.5 mM KCl, 2.3 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.98 mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM Hepes, 0.5mM EGTA et M de glucose) contenant 10 μM de Rolipram (un inhibiteur spécifique de la phosphodiesterase IV; la cinétique a été faite en présence de 3-isobutyl-1-méthylxanthine, IBMX 1mM, un inhibiteur de phosphodiesterase IV et V). Les cellules sont alors pré-incubées 15 minutes en présence de ces inhibiteurs et, s'il y a lieu, d'antagonistes. À la fin de cette incubation, les cellules sont stimulées avec les différents agonistes (100 μl) pour 5, 15, 30, 60 et 150 minutes (cinétique) et/ou 15 minutes (autre essais). Les réactions sont terminées par l'addition d'acide perchlorique (PCA 50% (5% final)) et le dosage de l'AMP cyclique est fait tel que décrit à la section 2.4.2. En ce qui concerne l'adénosine, le principe des essais pour la génération de l'AMP

cyclique est sensiblement le même sauf que les essais sont effectués dans les plaques de 6 puits et un temps de stimulation de 5 min. est utilisé. Il est important de noter que l'IBMX a été utilisé uniquement pour la cinétique de stimulation de la formation d'AMP cyclique par la  $PGE_2$  puisqu'il possède des propriétés antagonistiques sur les récepteurs de l'adénosine. Ainsi, afin de simplifier les expériences, le Rolipram fut été utilisé dans tous les essais subséquents même en ce qui concerne les essais avec les prostaglandines.

## **2.4. MÉTHODES DE DOSAGE**

### **2.4.1. Dosage de l'irET**

Les concentrations d'ET-1 sont mesurées par un essai radioimmunologique acheté de la compagnie Amersham (Oakville, Ontario, Canada). Brièvement, des volumes fixes d'échantillon (50  $\mu$ l) et d'antiserum (50  $\mu$ l) sont incubés durant 4 heures à 4°C. Suite à cette incubation de 4 heures, le compétiteur ( $^{125}$ I-ET-3; 50UI) est ajouté à chacun des tubes et une incubation de 16 à 24 heures est effectuée. Afin de séparer la fraction liée de celle non liée à l'anticorps, un deuxième anticorps (anti-antiserum lié à des particules magnétisables) est ajouté et incubé 10 minutes à la température de la pièce et la séparation est effectuée par magnétisme. La radioactivité est ensuite comptée à l'aide d'un compteur gamma; la quantité de radioactivité comptée est inversement proportionnelle à la concentration d'ET-1 présente dans les échantillons. Comme l'essai ne permet pas de

discriminer entre les trois formes d'endothéline, le terme ET immunoréactive (irET) est utilisé.

#### **2.4.2. Dosage de l'AMP cyclique**

Le dosage de l'AMP cyclique est effectué selon la méthode, légèrement modifiée, décrite par Salomon, 1970. Suite à l'arrêt de la réaction, par l'addition de PCA (acide perchlorique) 50 %, les plaques de culture sont mises sur glace et les cellules sont homogénéisées à l'aide d'un policeman. L'homogénat est placé dans un tube et une solution froide d'ATP et d'AMP cyclique (1mM de chacun) y est ajoutée. Les échantillons sont ensuite centrifugés et le surnageant de chacun est élué sur des colonnes de chromatographies (Dowex AG1X8 (100-200 mesh) 10 ml, contre ion: HCl ) et d'alumine, 10 ml) afin de séparer l' $[^3\text{H}]$ -AMP cyclique du  $[^3\text{H}]$ -ATP. Brièvement, les surnageants sont d'abord placés sur la colonne Dowex, l' $[^3\text{H}]$ -ATP est élué à l'aide de 3 ml d'eau et l' $[^3\text{H}]$ AMP cyclique y est retenue. Par la suite, les colonnes Dowex (AG 1X8) sont superposées aux colonnes d'alumine et 6 ml d'eau servent à éluer l' $[^3\text{H}]$ -AMP cyclique et les autres dérivés marqués. L' $[^3\text{H}]$ -AMP cyclique est élue par 6 ml d'une solution d'imidazole (0.1M). Chacune des fractions contenant l' $[^3\text{H}]$ -ATP et l' $[^3\text{H}]$ -AMP cyclique est comptée à l'aide d'un compteur à scintillation et la formation d'AMP cyclique est exprimée en pourcentage d' $[^3\text{H}]$ -ATP convertie en  $[^3\text{H}]$ -AMP cyclique suivant la formule suivante:

$$([^3\text{H}]\text{-AMP cyclique} / ([^3\text{H}]\text{-ATP} + [^3\text{H}]\text{-AMP cyclique})) \times 100. \quad [1]$$

### 2.4.3. Dosage des protéines totales

Les protéines sont dosées par la méthode de Bradford, en utilisant le réactif de la compagnie Bio-Rad (Mississauga, Ontario, Canada). Des échantillons de 10 µl sont utilisés, mélangés à 200 µl de réactif et incubés 15 minutes à la température de la pièce. Par la suite, la densité optique est mesurée à une longueur d'onde de 595 nm et les concentrations sont déterminées à l'aide d'une courbe standard d'albumine bovine.

## 2.5. SUBSTANCES CHIMIQUES ET PHARMACOLOGIQUES

Le milieu de culture, le sérum et les antibiotiques (pénicilline, streptomycine et la fungizone) proviennent de la compagnie Gibco (New-York, N-Y, USA). La protéase type XXIV, l'adénosine, l'ATP, l'AMP cyclique, le 3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), l'albumine de sérum bovin, l'imidazole et l'alumine proviennent de la compagnie Sigma Chemicals Co. (St-Louis, Mo, USA). Le réactif Biorad pour le dosage des protéines et le Dowex AG1X8 (100-200 mesh), proviennent de la compagnies Bio-Rad (Mississauga, Ontario, Canada). L' $[^3\text{H}]$ -adénine et les radioimmunoétalonnage pour l'ET-1 (RPA 555) sont de Amersham (Oakville, Ontario, Canada). Le butaprost, le AH23848B ( $[1\alpha(\text{Z}), 2\beta, 5\alpha]-(\pm)-7-[5-[[1,1'\text{-biphenyl}-4\text{-yl}]\text{methoxy}]-2-(4\text{-morpholinyl})-3\text{-oxocyclopentyl}] 4\text{-heptenoic acid}$ ), la  $\text{PGE}_2$ , l'Iloprost, la  $\text{PGD}_2$ , la  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , le AH6809 (6-

isopropoxy-9-oxoxanthine-2-carboxylic acid ), le AH22921X ( [1a(z),2b,5a]-(±)-7-[5-[[[(1,1'-biphenyl)-4-yl]methoxy]-2-(4-morpholinyl)-3-oxocyclopentyl]-5-heptenoic acid), le 16,16-dimethyl PGE<sub>2</sub>, et le 11-deoxy-PGE<sub>1</sub>, proviennent de Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, U.S.A.). Le XAC (xanthine amine congener), le CGS15943 (5-amino-9-chloro-2-(2furyl)1,2,4-triazolo[1,5-c]quinazoline), le CGS21680 (2-[*p*-(*-*carboxyethyl)-phenethylamino]-5'-N-ethylcarboxamidoadenosine), le CPA (*N*<sup>6</sup> cyclopentyladenosine), le NECA (5'-N-ethylcarboxamidoadenosine), l'enprofylline (3-*n*-propylxanthine), le DPCPX (8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine), l'aminophylline (theophylline ethylenediamine) et le 2-CADO (2-chloroadenosine) proviennent de la compagnie RBI (Research Biochemicals International, Natick, MA, USA). Le rolipram et le zaprinast proviennent de la compagnie Calbiochem (San Diego, CA, USA). Le ZM241385 (4-(2-[7-amino-2-{2-furyl}{1,2,4}triazolo{2,3-*a*}{1,3,5}triazin-5-yl-amino]ethyl)phenol) nous a été généreusement donné par le Dr Simon M. Poucher (Zeneca pharm., U.K.)

## 2.6. ANALYSE DES DONNÉES

Les valeurs d'EC<sub>50</sub> des différents agonistes ont été calculées à l'aide du logiciel Microcal<sup>TM</sup> (Microcal Software, MA, U.S.A.) suivant la formule:

$$\text{Réponse} = (E_{\text{max}} X^n) / (EC_{50}^n + X^n) \quad [2]$$

où  $X$  est la concentration de la substance pharmacologique,  $E_{\max}$  est la réponse maximale et  $n$  est le coefficient de Hill. Les valeurs des constantes de dissociation des antagonistes ( $K_i$ ) ont été déterminées par la modification de la *null method* décrite par Lazareno & Roberts, 1987 et aussi utilisée par d'autres groupes de recherche (Hernandez *et al.*, 1993; Peakman & Hill, 1994; Alexander *et al.*, 1996; Cooper *et al.*, 1997). En résumé, une courbe concentrations-réponses avec l'agoniste NECA est produite et la concentration ( $C = 10\mu\text{M}$ ) de NECA est utilisée puisqu'elle est plus grande que l' $EC_{50}$  déterminé pour cet agoniste. La concentration d'antagoniste ( $IC_{50}$ ) nécessaire pour diminuer de moitié la réponse produite par le NECA ( $10\mu\text{M}$ ) est alors déterminée à l'aide du logiciel Microcal<sup>TM</sup>. Ensuite, une concentration ( $C'$ ), produisant une réponse équivalente à la moitié de celle produite par la concentration  $C$  en absence d'antagoniste, est déterminée. L'affinité apparente peut être alors calculée suivant la relation:

$$C/C' = (IC_{50} / K_i) + 1 \quad [3]$$

Les valeurs des différents  $pA_2$  ( $-\log K_i$ ) peuvent ainsi être calculées.

Toutes les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  s.e.m. de  $n$  expériences indépendantes effectuées en simplicité. Lorsque nécessaire, une analyse statistique est effectuée en utilisant le test d'analyse de variance (ANOVA) suivi d'un post test Bonferroni ou Dunnet selon le cas.



## RÉSULTATS

### 3.1. PRODUCTION/SÉCRÉTION D'irET.

#### 3.1.1. Production/sécrétion d'irET par les cellules épithéliales de la trachée de cobaye en culture.

Les cellules épithéliales de la trachée de cobaye produisent et sécrètent uniquement la forme ET-1 de la famille des endothélines (Laporte *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1997) Cette ET-1 peut être mesurée dans le surnageant de cellules en culture. La figure 5 montre que les cellules épithéliales de la trachée de cobaye produisent et sécrètent l'ET-1 de façon constitutive et constante pour une durée d'au moins 24 heures. Suite à une incubation de 24 heures, la production/sécrétion de l'ET-1 atteint  $9535 \pm 483$  pg/mg de protéines totales, soit 15 fois celle observée après 1 h.

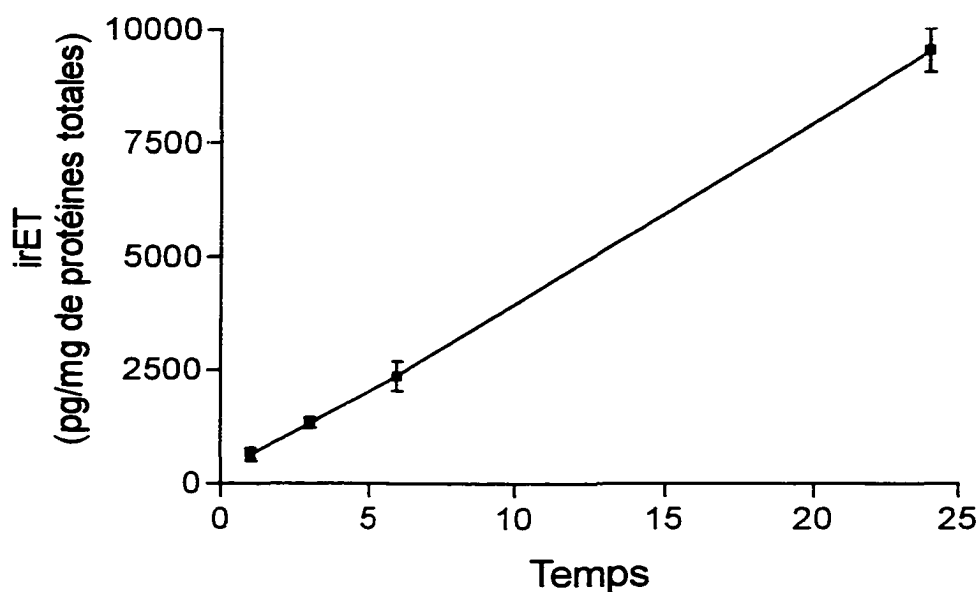
### 3.2. RÔLE DE LA $PGE_2$ SUR LA PRODUCTION/SÉCRÉTION DE L'ENDOTHÉLINE-1 ET SUR LA FORMATION D'AMP CYCLIQUE PAR L'ÉPITHÉLIUM DES VOIES AÉRIENNES

#### 3.2.1. Effet de la prostaglandine $E_2$ sur la production/sécrétion d'endothéline -1 par les cellules épithéliales de la trachée de cobaye.

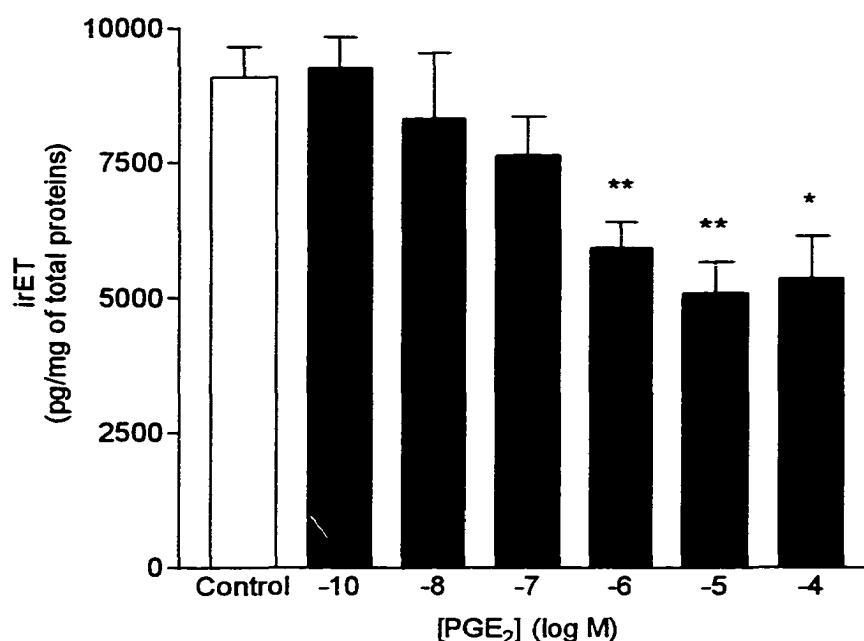
La production/sécrétion de l'ET-1 par les cellules épithéliales de la trachée de cobaye est influencée par la présence de la prostaglandine E<sub>2</sub>. La prostaglandine E<sub>2</sub> ( $1 \times 10^{-10}$  à  $1 \times 10^{-4}$  M) diminue la production/sécrétion d'ET-1, en fonction de la concentration utilisée, par les cellules en culture (figure 6). Une diminution significative de la production d'ET-1 est observée lorsque les cellules sont soumises à des concentrations de  $1 \times 10^{-7}$  à  $1 \times 10^{-4}$  M de PGE<sub>2</sub> diminuant ainsi le niveau de production/sécrétion basale de 18%, 31%, 45% et 41%. La valeur de l'IC<sub>50</sub>, déterminée pour cet effet inhibiteur de la PGE<sub>2</sub> sur la production d'ET-1, est de  $2.71 \times 10^{-7} \pm 2.07 \times 10^{-7}$  M ( $pD_2 = 6.6 \pm 0.3$ ) (Tableau 3).

### **3.2.2. Effet de la prostaglandine E2 sur la formation d'AMP cyclique par les cellules épithéliales de la trachée de cobaye.**

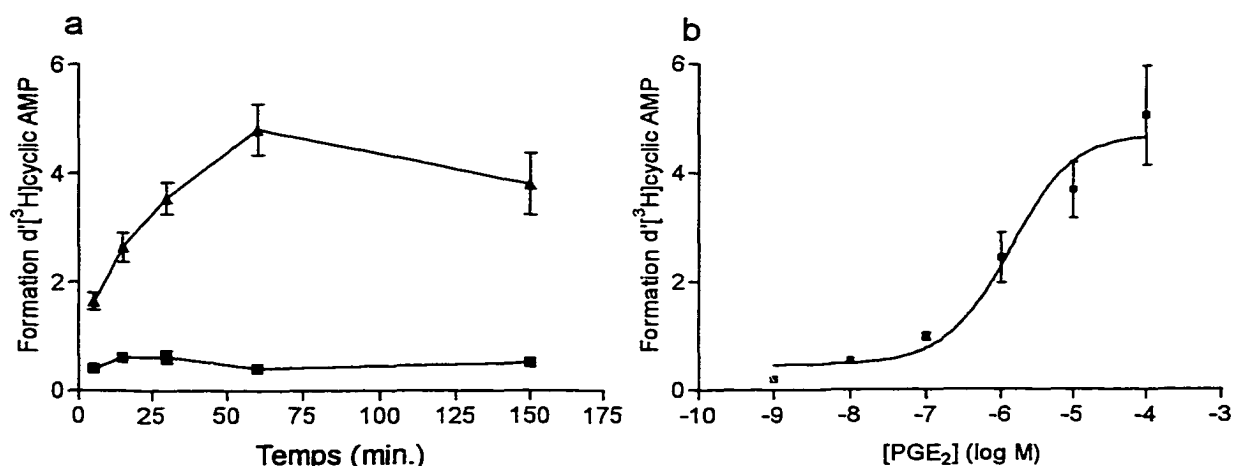
Dans plusieurs tissus et cultures cellulaires, l'effet de la PGE<sub>2</sub> est relayé par la génération d'AMP cyclique (Smith *et al.*, 1984; Noland *et al.*, 1992; de Brum-Fernandes *et al.*, 1996) ou par son inhibition (Sonnenburg & Smith, 1988; Sonnenburg *et al.*, 1990). Au niveau des cellules épithéliales en culture, nos résultats montrent que la PGE<sub>2</sub> stimule la formation d'AMP cyclique et ce, en fonction de la concentration et du temps d'incubation de la PGE<sub>2</sub> (figure 7). La PGE<sub>2</sub> (1  $\mu$ M) augmente de façon significative la conversion de l' [<sup>3</sup>H]-ATP en [<sup>3</sup>H]-AMP cyclique suite à une stimulation d'au moins 5 minutes. L'augmentation de la conversion est observée durant 60 minutes et est maintenue pendant au moins 150 minutes (figure 7A). Puisque 15 minutes d'incubation



**Figure 5.** Production et sécrétion basale d'irET par les cellules épithéliales de la trachée de cobaye. Les cellules épithéliales sont incubées à 37°C en présence de milieu de culture frais durant 1, 3, 6 et 24 heures et les niveaux d'irET sont mesurés tel qu'indiqué dans la section matériel et méthodes. Chaque point représente la moyenne  $\pm$  l'erreur-type de 4 déterminations faites sur différentes préparations cellulaires.



**Figure 6.** Effet de la prostaglandine E<sub>2</sub> sur la production/sécrétion basale d'irET par les cellules épithéliales de la trachée de cobaye. Les cellules sont incubées 24 heures à 37°C en absence (Témoin) ou en présence de concentrations croissantes de PGE<sub>2</sub> (1X10<sup>-10</sup> à 1X10<sup>-4</sup> M) et les niveaux d'irET sont mesurés tel qu'indiqué dans la section matériel et méthodes. Chaque colonne représente la moyenne ± l'erreur-type de 4 à 12 déterminations faites sur différentes préparations cellulaires (\* P < 0.05, \*\* P < 0.01).



**Figure 7.** Effet de la prostaglandine E<sub>2</sub> sur la génération d'AMP cyclique par les cellules épithéliales de la trachée de cobaye. a: Les cellules sont préincubées 15 min. en présence de 1 mM IBMX (inhibiteur de phosphodiesterase Iv et V) et ensuite stimulées en présence (cercles ouverts) ou en absence (triangles ouverts) PGE<sub>2</sub> (1X10<sup>-6</sup> M) pour des durées de 5, 15, 30, 60 et 150 min. avant l'évaluation du pourcentage de conversion de l' [<sup>3</sup>H]- ATP en [<sup>3</sup>H]-AMP cyclique tel qu'indiqué dans la section matériel et méthodes. Chaque point représente la moyenne  $\pm$  l'erreur-type de 4 déterminations faites sur différentes préparations cellulaires. b: Les cellules sont pré-incubées 15 min. en présence de 10  $\mu$ M Rolipram (un inhibiteur sélectif de la phosphodiesterase IV) et ensuite stimulées avec des concentrations croissantes de PGE<sub>2</sub> (1X10<sup>-9</sup> M à 1x10<sup>-4</sup> M) durant 15 minutes et l'évaluation du pourcentage de conversion de l' [<sup>3</sup>H]- ATP en [<sup>3</sup>H]-AMP cyclique est faite tel qu'indiqué dans la section matériel et méthodes. Chaque point représente la moyenne  $\pm$  l'erreur-type de 4 déterminations faites sur différentes préparations cellulaires.

**TABLEAU 3.  $EC_{50}$  et  $IC_{50}$  de l'effet inhibiteur sur la production et la sécrétion d'ET-1 et la formation d'AMP cyclique de la prostaglandines  $E_2$ .**

	$IC_{50}$ ( $\mu M$ ) ( $pD_2$ )	$EC_{50}$ ( $\mu M$ ) ( $pD_2$ )
<i>Inhibition de la production d'ET-1</i>	$0.27 \pm 0.21$ ( $6.57 \pm 0.25$ )	-
<i>Stimulation de la génération d'AMP cyclique</i>	-	$1.3 \pm 1.9$ ( $5.9 \pm 0.2$ )

Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  s.e.m. de 4 à 8 déterminations faites à partir de préparations cellulaires différentes.

sont suffisantes pour observer les effets de la prostaglandine E<sub>2</sub> sur la formation d'AMP cyclique, ce temps sera utilisé dans les essais subséquents.

Des concentrations croissantes de PGE<sub>2</sub> (1 X 10<sup>-8</sup> à 1 X 10<sup>-4</sup> M) stimulent de façon significative la conversion de l' [<sup>3</sup>H]-ATP en [<sup>3</sup>H]-AMP cyclique et l'effet maximal tend à être obtenu à une concentration de 100μM où l'on observe une réponse de 5.02 ± 0.90 % de conversion comparativement à 0.41 ± 0.03 % pour la mesure du niveau basal (figure 7 B). La valeur du pD<sub>2</sub> pour la PGE<sub>2</sub> sur la formation d'AMP cyclique est de 5.9 ± 0.2 (tableau 3).

### **3.3. CARACTÉRISATION DU RÉCEPTEUR AUX PROSTAGLANDINES RESPONSABLE DE L'AUGMENTATION D'AMP CYCLIQUE ET DE LA DIMINUTION DE LA PRODUCTION/SÉCRÉTION D'ET-1 AU NIVEAU DES CELLULES ÉPITHÉLIALES DE LA TRACHÉE DE COBAYE**

#### **3.3.1. Effet des prostaglandines sur la génération d'AMP cyclique par les cellules épithéliales de la trachée de cobaye en culture.**

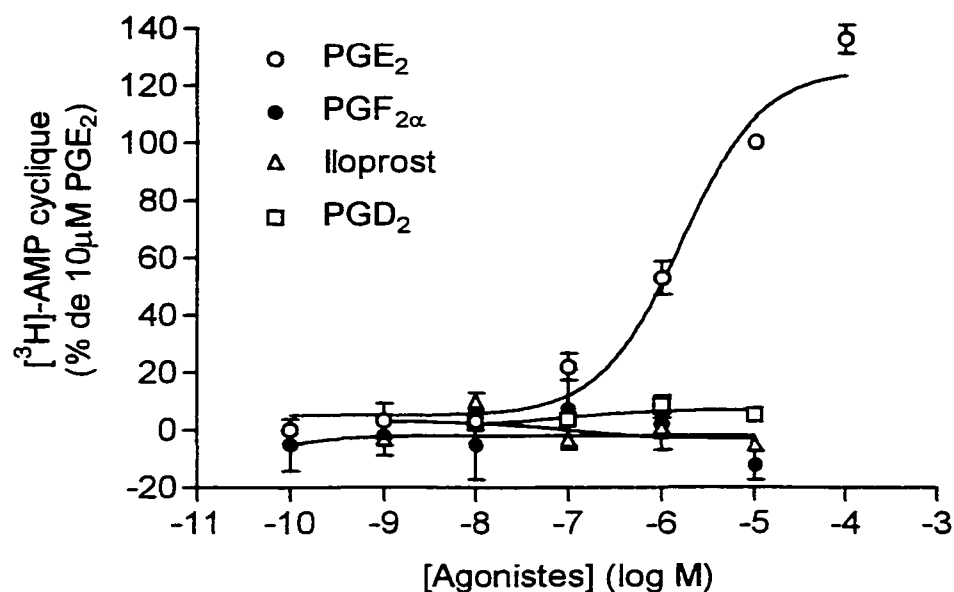
Tel que mentionné dans l'introduction, la caractérisation des récepteurs aux prostaglandines se fait par la détermination de l'ordre de puissance des agonistes naturels et par l'utilisation d'agonistes et d'antagonistes synthétiques. Nos résultats montrent que la PGE<sub>2</sub> est la seule prostaglandine à exercer un effet stimulateur sur la formation d'AMP cyclique par les cellules épithéliales de la trachée de cobaye, tandis que la PGD<sub>2</sub>, la PGF<sub>2α</sub>

et l'Iloprost, un analogue stable de la prostacycline, semblent incapables de stimuler l'adénylyl cyclase (Figure 8).

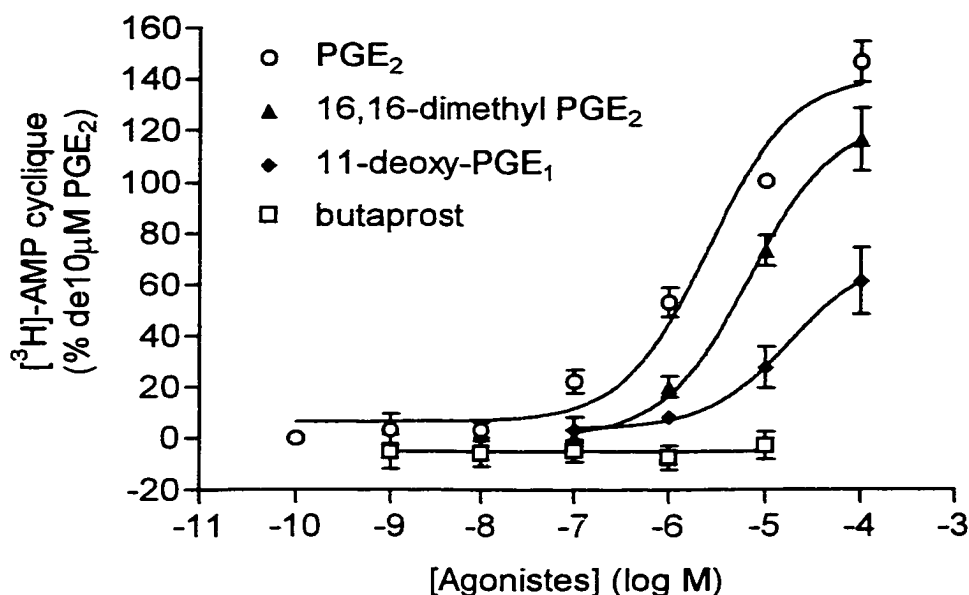
### **3.3.2. Effets des analogues synthétiques de la PGE<sub>2</sub> sur la génération d'AMP cyclique par les cellules épithéliales de la trachée de cobaye en culture.**

Afin d'identifier le récepteur responsable de l'augmentation d'AMP cyclique par les cellules épithéliales de la trachée de cobaye, cinq analogues de la PGE<sub>2</sub>, possédant différents degrés de sélectivité, ont été utilisés. La PGE<sub>2</sub> (non sélectif, Tableau 1) stimule la production d'AMP cyclique et est le plus puissant des agonistes utilisés (figure 9). L'agoniste sélectif EP<sub>1</sub>, l'Iloprost, et l'agoniste sélectif EP<sub>2</sub>, le butaprost, ne montrent aucun effet stimulateur sur la formation d'AMP cyclique par les cellules en culture, même à des concentrations allant jusqu'à 10 µM (figure 9). L'agoniste non sélectif EP<sub>1</sub>/EP<sub>3</sub>, le 16,16-dimethyl PGE<sub>2</sub>, et l'agoniste EP<sub>2</sub>, le 11-deoxy PGE<sub>1</sub>, à des concentrations allant de 1X10<sup>-7</sup> à 1X10<sup>-4</sup> M, stimulent la formation d'AMP cyclique, mais ils sont moins puissants que la PGE<sub>2</sub>. L'ordre de puissance des différents analogues utilisés est PGE<sub>2</sub> > 16,16-dimethyl PGE<sub>2</sub> > 11-deoxy PGE<sub>1</sub> >>> Butaprost, Iloprost (Figure 9; pour l'iloprost, figure 8).





**Figure 8.** Effet des différentes prostaglandines naturelles sur la génération d'AMP cyclique par les cellules épithéliales de la trachée de cobaye. Les cellules sont préincubées 15 min. en présence de 10  $\mu$ M Rolipram (un inhibiteur sélectif de la phosphodiesterase IV) et ensuite stimulées avec des concentrations croissantes ( $1 \times 10^{-10}$  M à  $1 \times 10^{-5}$  M) de PGD<sub>2</sub> (Carrés ouverts), de PGE<sub>2</sub> (cercles ouverts), de PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  (triangles ouverts) et d'Iloprost (un analogue stable de la prostacycline, PGI<sub>2</sub>, cercle fermés) durant 15 minutes et l'évaluation du pourcentage de conversion de l' [3H]- ATP en [3H]-AMP cyclique est faite tel qu'indiqué dans la section matériel et méthodes. Les résultats sont exprimés en pourcentages de la réponse obtenue par 10  $\mu$ M de PGE<sub>2</sub>. Chaque point représente la moyenne  $\pm$  l'erreur-type de 4 déterminations faites sur différentes préparations cellulaires.



**Figure 9.** Effet de la PGE<sub>2</sub> et de différents analogues sur la génération d'AMP cyclique par les cellules épithéliales de la trachée de cobaye. Les cellules sont préincubées 15 min. en présence de 10 μM Rolipram (un inhibiteur sélectif de la phosphodiesterase IV) et ensuite stimulées avec des concentrations croissantes (1X10<sup>-10</sup> M à 1X10<sup>-5</sup> M) de PGE<sub>2</sub> (cercles ouverts), de butaprost (un agoniste sélectif du récepteur EP<sub>2</sub>, carrés ouverts), de 16,16-diméthyl PGE<sub>2</sub> (triangles fermés, 1X10<sup>-7</sup> à 1X10<sup>-4</sup> M) et de 11-deoxy PGE<sub>1</sub> (losanges fermés, 1X10<sup>-7</sup> à 1X10<sup>-4</sup> M) durant 15 minutes et l'évaluation du pourcentage de conversion de l' [<sup>3</sup>H]- ATP en [<sup>3</sup>H]-AMP cyclique est faite tel qu'indiqué dans la section matériel et méthodes. Les résultats sont exprimés en pourcentages de la réponse obtenue par 10 μM de PGE<sub>2</sub>. Chaque point représente la moyenne ± l'erreur-type de 4 à 8 déterminations faites sur différentes préparations cellulaires.

### 3.3.3. Effet des antagonistes sélectifs EP<sub>4</sub>, le AH23848B et le AH22921X, sur la génération d'AMP cyclique induite par la PGE<sub>2</sub>.

Comme le butaprost, un agoniste sélectif EP<sub>2</sub>, est inefficace afin de stimuler la génération d'AMP cyclique par les cellules épithéliales de la trachée de cobaye, la présence de ce type de récepteur fut écarté. Par contre, la présence de récepteurs EP<sub>4</sub> restait à examiner. Pour se faire, deux antagonistes sélectifs EP<sub>4</sub>, soit le AH23848B et le AH22921X (Coleman *et al.*, 1994) furent utilisés. L'antagoniste sélectif EP<sub>4</sub>, le AH23848B, à des concentrations de 10 et de 100 µM inhibe la formation d'AMP cyclique induite par la PGE<sub>2</sub>, en fonction de la concentration utilisée (figure 10A). En présence d'AH23848B, la courbe concentrations-réponses de la PGE<sub>2</sub> est déplacée vers la droite. Puisque l'effet maximal de la courbe concentrations-réponses en présence de l'antagoniste n'est pas atteint, les valeurs du pA<sub>2</sub> et la constante de dissociation de cet antagoniste n'ont pu être déterminées.

Des résultats semblables ont été observés lorsque le AH22921X a été utilisé. Cet agent pharmacologique, à des concentrations de 10, 50 et 100 µM, déplace la courbe concentrations-réponses de la PGE<sub>2</sub> vers la droite en fonction de la concentration d'antagoniste utilisée (Figure 10B). Puisque l'effet maximal de la courbe concentrations-réponses en présence de l'antagoniste n'est pas atteint, la valeur du pA<sub>2</sub> et la constante de dissociation de cet antagoniste n'ont pu être déterminées.

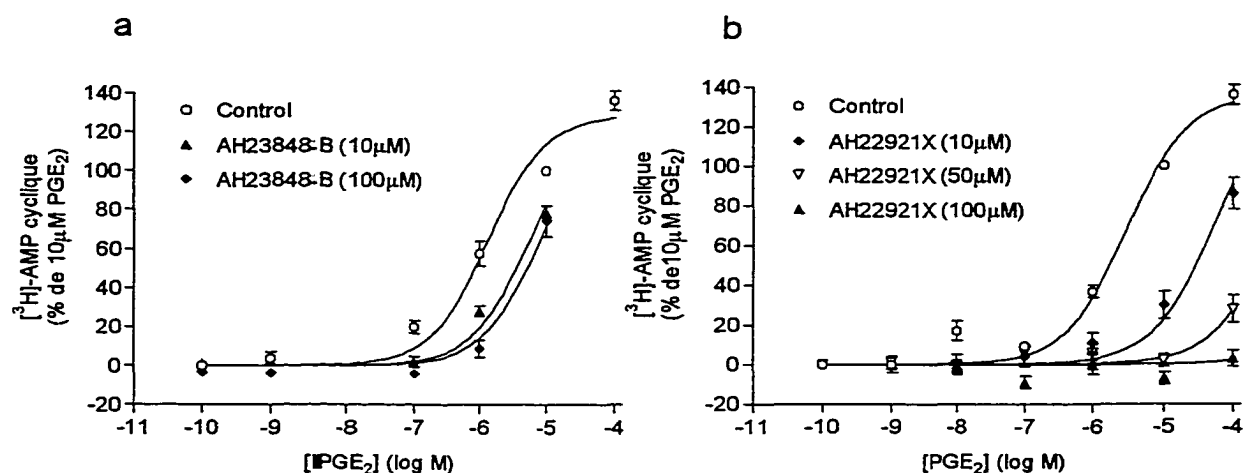
### 3.3.4. Effet du AH6809 sur la génération d'AMP cyclique induite par la PGE<sub>2</sub>.

Le AH 6809 est un antagoniste des récepteurs EP<sub>1</sub> et DP (Coleman *et al.*, 1987; Keery & Lumley, 1988). Récemment, il a été démontré que cet agent possédait une action antagoniste sur la génération d'AMP cyclique induite par la PGE<sub>2</sub> sur des cellules COS-7 exprimant le récepteur EP<sub>2</sub> humain (Woodward *et al.*, 1995). Puisque l'Iloprost (agoniste EP<sub>1</sub>) et la PGD<sub>2</sub> sont inefficaces pour stimuler la formation d'AMP cyclique sur les cellules épithéliales de la trachée de cobaye (Figure 8 et 9), le AH6809 est alors utilisé comme antagoniste du récepteur EP<sub>2</sub>. Une concentration de 10 µM de cet agent pharmacologique produit un déplacement de 30 fois la courbe concentrations-réponses de la PGE<sub>2</sub> en absence d'antagoniste au niveau des cellules COS-7 exprimant le récepteur EP<sub>2</sub> (Woodward *et al.*, 1995))

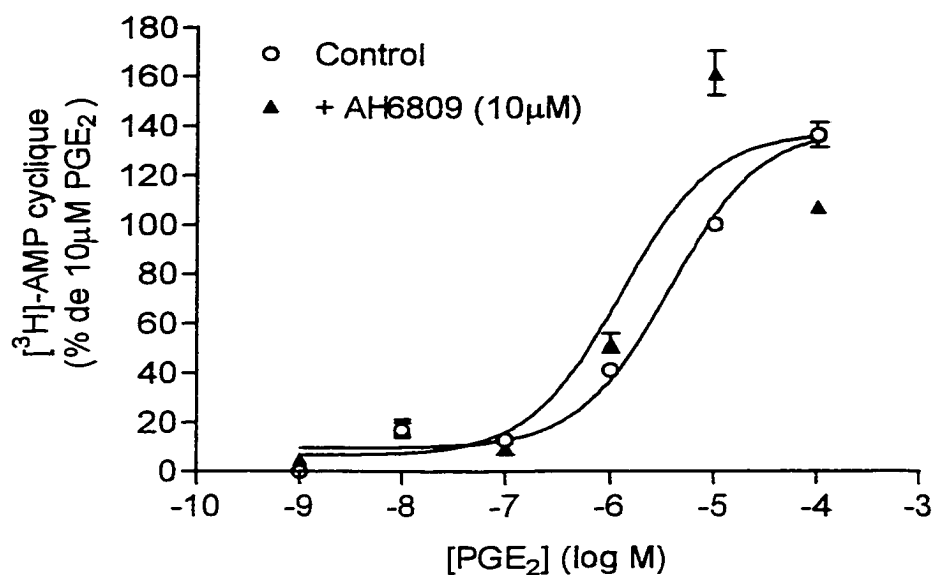
Les résultats présentés à la figure 11 montrent que le AH 6809 (10 µM) est inefficace pour diminuer la génération d'AMP cyclique induite par la PGE<sub>2</sub> sur les cellules épithéliales de la trachée de cobaye. Au contraire, la présence d'AH6908 semble légèrement augmenter la génération d'AMP cyclique induite par la PGE<sub>2</sub>, mais les deux courbes ne sont pas significativement différentes.

### 3.3.5. Effet du AH23848B sur l'effet inhibiteur de la PGE<sub>2</sub> sur la production d'ET-1

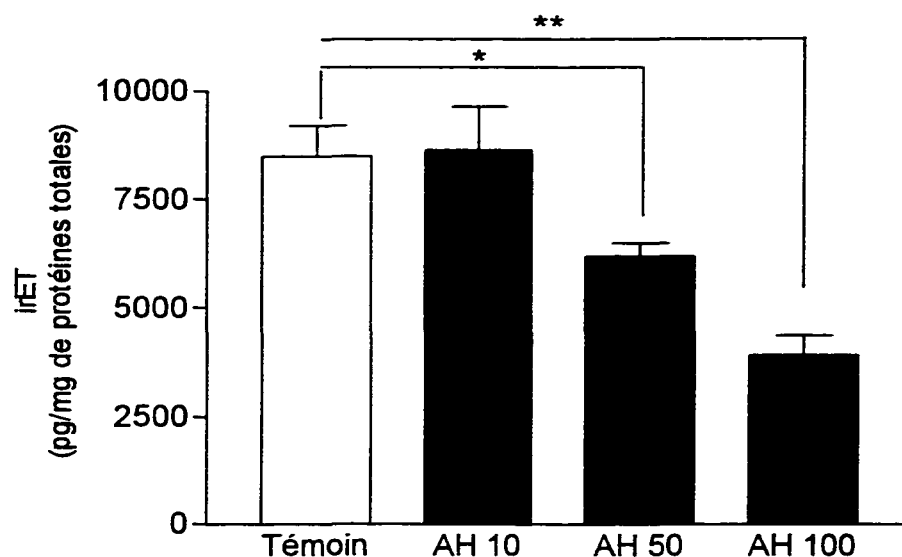
L'incubation des cellules épithéliales de la trachée de cobaye en présence du AH23848B (10, 50 et 100 µM) mène à une inhibition de la production/sécrétion d'irET



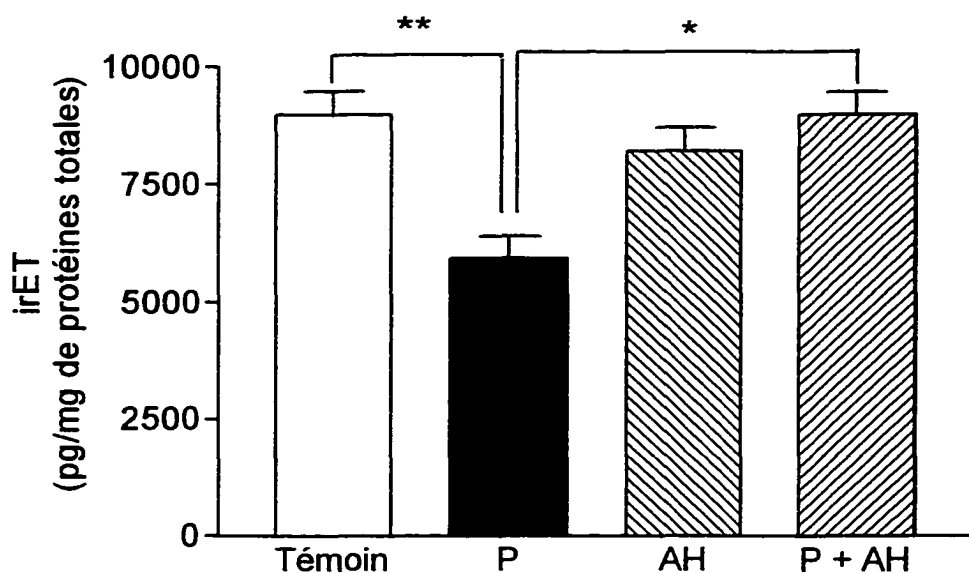
**Figure 10.** Effet du AH23848 et du AH22921X sur la génération d'AMP cyclique induite par la PGE<sub>2</sub> sur les cellules épithéliales de la trachée de cobaye. Les cellules sont préincubées 15 min. en présence de 10 μM Rolipram (un inhibiteur sélectif de la phosphodiesterase IV) et a) en présence (triangles fermés: 10 μM, losanges fermés: 100 μM) ou en absence (cercles ouverts) de AH23848B et b) en présence (losange fermés: 10 μM, triangles ouverts: 50 μM et triangles fermés: 100 μM) ou en absence (cercles ouverts) de AH22921X ensuite stimulées avec des concentrations croissantes (1X10<sup>-10</sup> M à 1X10<sup>-5</sup> M) de PGE<sub>2</sub> durant 15 minutes et l'évaluation du pourcentage de conversion de l' [<sup>3</sup>H]- ATP en [<sup>3</sup>H]-AMP cyclique est faite tel qu'indiqué dans la section matériel et méthodes. Chaque point représente la moyenne ± l'erreur-type de 3 à 8 déterminations faites sur différentes préparations cellulaires.



**Figure 11.** Effet du AH6809 sur la génération d'AMP cyclique induite par la PGE<sub>2</sub>. Les cellules sont préincubées 15 min. en présence de 10 μM Rolipram (un inhibiteur sélectif de la phosphodiesterase IV) et en présence (triangles fermés) ou en absence (cercles ouverts) de 10 μM de AH6809 et ensuite stimulées avec des concentrations croissantes (1X10<sup>-8</sup> M à 1X10<sup>-4</sup> M) de PGE<sub>2</sub> durant 15 minutes et l'évaluation du pourcentage de conversion de l' [<sup>3</sup>H]- ATP en [<sup>3</sup>H]-AMP cyclique est faite tel qu'indiqué dans la section matériel et méthodes. Chaque point représente la moyenne ± l'erreur-type de 8 déterminations faites sur différentes préparations cellulaires.



**Figure 12.** Effet du AH23848B sur la production/sécrétion d'irET par les cellules épithéliales de la trachée de cobaye. Les cellules épithéliales en culture sont incubées 24 heures à 37°C en absence (Témoin) ou en présence (AH) de concentrations croissantes (10, 50 et 100  $\mu$ M) de AH23848B et les niveaux d'irET sont mesurés tel qu'indiqué dans la section matériel et méthodes. Chaque colonne représente la moyenne  $\pm$  l'erreur-type de 4 déterminations faites sur différentes préparations cellulaires (\*P < 0.05, \*\*P < 0.01).



**Figure 13.** Effet du AH23848B sur l'inhibition de la production/sécrétion d'irET induite par la  $PGE_2$ . Les cellules épithéliales de la trachée de cobayes sont incubées en présence (P) ou en absence (Témoin) de  $PGE_2$  (1  $\mu M$ ) et/ou de AH23848B (10  $\mu M$ ) durant 24 heures à 37°C et les niveaux d'irET sont mesurés tel qu'indiqué dans la section matériel et méthodes. Chaque colonne représente la moyenne  $\pm$  l'erreur-type de 4 déterminations faites sur différentes préparations cellulaires (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ).

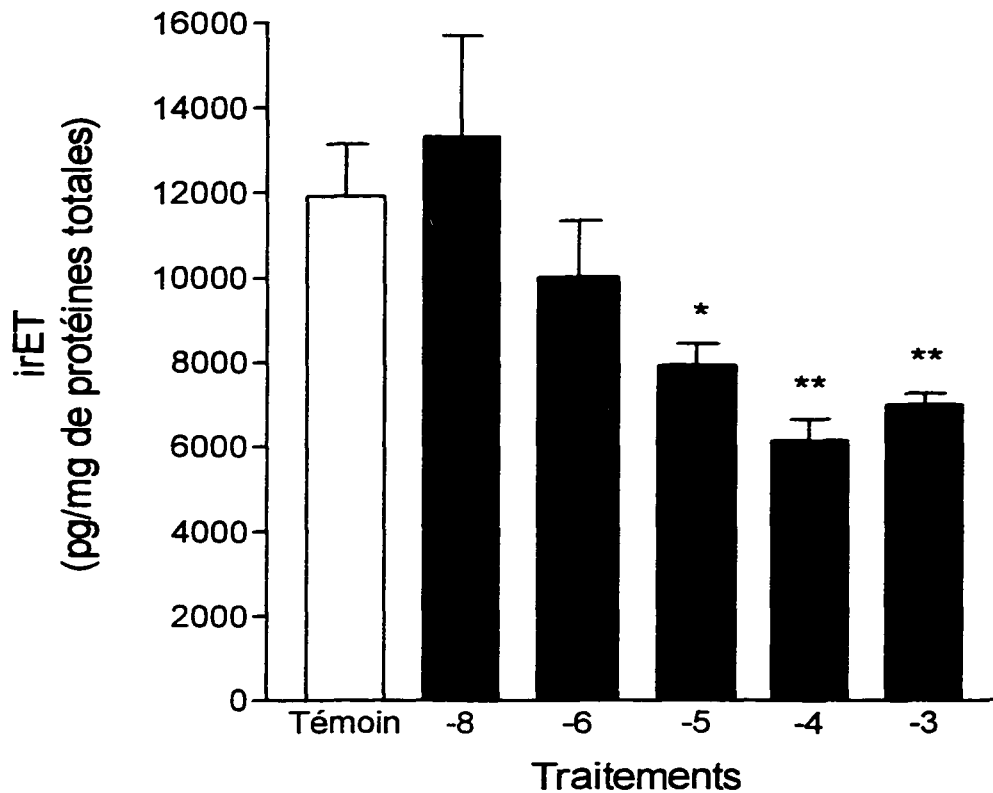


en fonction de la concentration utilisée. A faible concentration (10  $\mu\text{M}$ ), la production d'ET-1 par l'épithélium demeure inchangée. Par contre, à fortes concentrations (50 et 100  $\mu\text{M}$ ), nos résultats montrent une inhibition significative de la production/sécrétion d'ET-1 par l'épithélium (figure 12). La production/sécrétion de l'ET-1 est inhibée de façon significative par l'incubation des cellules épithéliales de la trachée de cobaye en présence de la  $\text{PGE}_2$  (1  $\mu\text{M}$ ) durant 24 heures. Cet effet est entièrement renversé par la présence de l'antagoniste sélectif  $\text{EP}_4$ , le AH23848B, à une concentration de 10  $\mu\text{M}$  faisant passer les niveaux de production/sécrétion du peptide de  $5914 \pm 478$  (en présence de  $\text{PGE}_2$  seule) à  $8972 \pm 480$  ( $\text{PGE}_2$  (1  $\mu\text{M}$  + AH23848B 10  $\mu\text{M}$ ) (figure13).

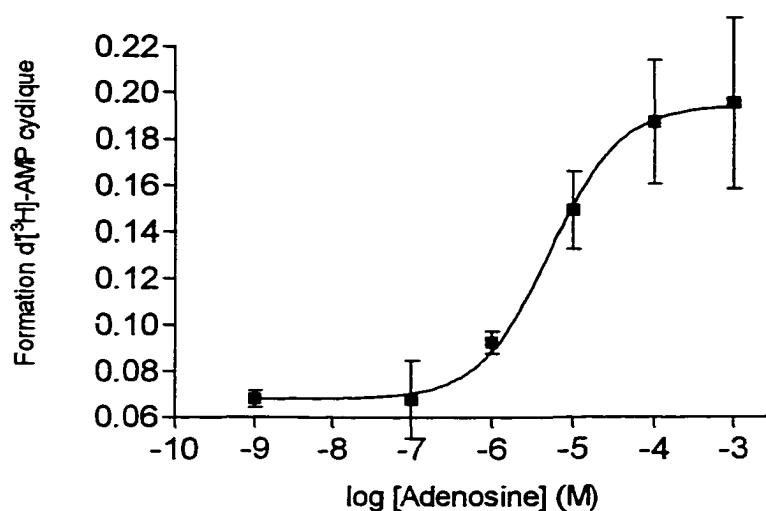
### **3.4. RÔLE DE L'ADÉNOSINE SUR LA PRODUCTION/SÉCRÉTION D'ET-1 ET SUR LA FORMATION D'AMP CYCLIQUE PAR L'ÉPITHÉLIUM DES VOIES AÉRIENNES**

#### **3.4.1. Effet de l'adénosine sur la production/sécrétion d'irET par les cellules épithéliales de la trachée de cobaye.**

La production/sécrétion d'irET par les cellules épithéliales de la trachée de cobaye est inhibée en présence d'adénosine. La présence d'adénosine ( $1 \times 10^{-8}$  à  $1 \times 10^{-3}$  M) durant 24 heures diminue la production/sécrétion basale d'irET par les cellules en culture en fonction de la concentration utilisée. Une diminution significative des niveaux d'irET est observée en présence de  $1 \times 10^{-5}$ ,  $1 \times 10^{-4}$  et  $1 \times 10^{-3}$  M d'adénosine et résulte en des



**Figure 14.** Effet de l'adénosine sur la production/sécrétion d'irET par les cellules épithéliales de la trachée de cobaye en culture. Les cellules sont incubées 24 heures à 37°C en absence (Témoin) ou en présence de concentrations croissantes d'adénosine ( $1 \times 10^{-8}$  à  $1 \times 10^{-3}$  M) et les niveaux d'irET sont mesurés tel qu'indiqué dans la section matériel et méthodes. Chaque colonne représente la moyenne  $\pm$  l'erreur-type de 4 à 12 déterminations faites sur différentes préparations cellulaires (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ).



**Figure 15.** Effet de l'adénosine sur la génération d'AMP cyclique par les cellules épithéliales de la trachée de cobaye. Les cellules sont préincubées 15 min. en présence de 10  $\mu$ M Rolipram (un inhibiteur sélectif de la phosphodiesterase IV) et ensuite stimulées avec des concentrations croissantes d'adénosine ( $1 \times 10^{-9}$  M à  $1 \times 10^{-3}$  M) durant 5 minutes et l'évaluation du pourcentage de conversion de l' [<sup>3</sup>H]- ATP en [<sup>3</sup>H]-AMP cyclique est faite tel qu'indiqué dans la section matériel et méthodes. Chaque point représente la moyenne  $\pm$  l'erreur-type de 4 déterminations faites sur différentes préparations cellulaires.

**TABLEAU 4.  $EC_{50}$  et  $IC_{50}$  de l'effet inhibiteur et stimulateur de l'adénosine sur la production et la sécrétion d'ET-1 et la formation d'AMP cyclique.**

	$IC_{50}$ ( $\mu M$ ) ( $pD_2$ )	$EC_{50}$ ( $\mu M$ ) ( $pD_2$ )
<i>Inhibition de la production d'ET-1</i>	$1.2 \pm 0.9$ ( $5.9 \pm 0.3$ )	-
<i>Stimulation de la génération d'AMP cyclique</i>	-	$10.2 \pm 0.2$ ( $5.0 \pm 0.1$ )

Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  s.e.m. de 4 à 8 déterminations faites à partir de préparations cellulaires différentes.

inhibitions de 30, 38 et de 38% respectivement (Figure 14). La valeur du  $pD_2$  déterminée pour cet effet inhibiteur de l'adénosine est de  $5.9 \pm 0.3$  (Tableau 4).

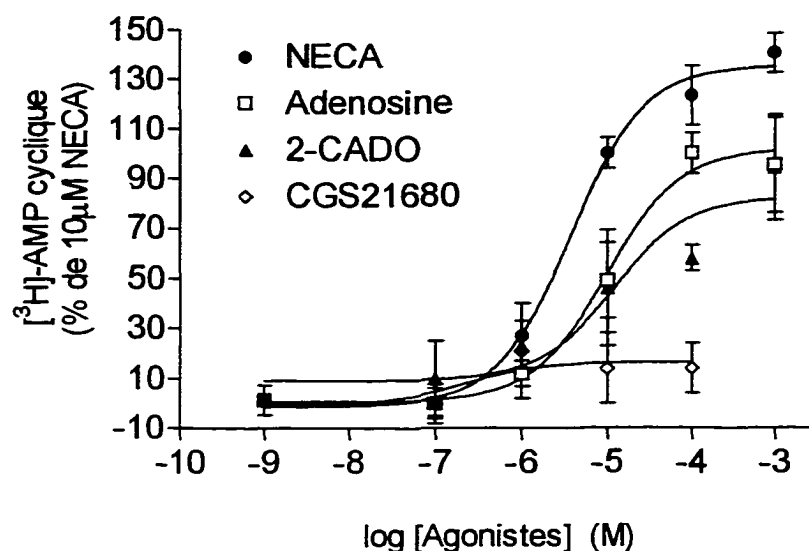
#### **3.4.2. Effet de l'adénosine sur la génération d'AMP cyclique par les cellules épithéliales de la trachée de cobaye en culture.**

La génération d'AMP cyclique par les cellules épithéliales de la trachée de cobaye en culture est augmentée par la présence d'adénosine. En présence de Rolipram ( $10\mu M$ ) le pourcentage de conversion de l' $[^3H]$ -ATP en  $[^3H]$ -AMP cyclique par les cellules épithéliales est de  $0,068 \pm 0.003$  %. Suite à une stimulation des cellules par des concentrations croissantes d'adénosine ( $1 \times 10^{-7}$  à  $1 \times 10^{-3}$  M), le pourcentage de conversion de l' $[^3H]$ -ATP en  $[^3H]$ -AMP cyclique est augmenté de manière dépendante de la concentration utilisée (Figure 15). Une augmentation significative est observée à des concentration de  $1 \times 10^{-6}$  à  $1 \times 10^{-3}$  M où le pourcentage de conversion passe de  $0.093 \pm 0.001$  à  $0.195 \pm 0.037$  %, soit une augmentation du triple par rapport au niveau obtenu en présence de Rolipram ( $10 \mu M$ ) seul. La valeur du  $pD_2$  déterminé pour cet effet stimulateur de l'adénosine sur la production d'AMP cyclique est de  $5.0 \pm 0.1$  (Tableau 4)

### **3.5. CARACTÉRISATION DU RÉCEPTEUR À L'ADÉNOSINE RESPONSABLE DE L'AUGMENTATION D'AMP CYCLIQUE ET DE LA DIMINUTION DE LA PRODUCTION/SÉCRÉTION D'ET-1 AU NIVEAU DES CELLULES ÉPITHÉLIALES DE LA TRACHÉE DE COBAYE.**

#### **3.5.1. Effets de l'adénosine et des analogues de l'adénosine sur la génération d'AMP cyclique par les cellules épithéliales de la trachée de cobaye en culture.**

L'adénosine, le 2-Cl-Adénosine (2CADO) et l'agoniste  $A_2$  non-sélectif, le NECA ( $1 \times 10^{-7}$  à  $1 \times 10^{-3}$  M), stimulent la génération d'AMP cyclique par les cellules épithéliales de la trachée de cobaye et les effets maximaux de ces trois agonistes sont observés aux concentrations de  $1 \times 10^{-5}$ ,  $1 \times 10^{-4}$  et  $1 \times 10^{-3}$  M, respectivement. À l'opposé, l'agoniste sélectif  $A_{2A}$ , le CGS21680 ( $1 \times 10^{-6}$  à  $1 \times 10^{-4}$  M), est complètement inefficace à stimuler la génération d'AMP cyclique (Figure 16). L'ordre de puissance de ces agonistes sur la génération d'AMP cyclique est: NECA > adénosine  $\geq$  2CADO >>> CGS21680 (inefficace). L'activité intrinsèque de l'adénosine et du 2CADO à stimuler la génération d'AMP cyclique, représente respectivement  $75 \pm 3$  % et  $61 \pm 9$  % celle du NECA. Les valeurs de  $pD_2$  apparentes de l'adénosine, du 2CADO et du NECA sont de  $5.0 \pm 0.1$ ,  $4.9 \pm 0.4$  et de  $5.4 \pm 0.1$  respectivement (Tableau 5).



**Figure 16.** Effet de l'adénosine et des analogues de l'adénosine sur la génération d'AMP cyclique par les cellules épithéliales de la trachée de cobayes. Les cellules sont préincubées 15 min. en présence de 10  $\mu$ M Rolipram (un inhibiteur sélectif de la phosphodiesterase IV) et ensuite stimulées avec des concentrations croissantes d'adénosine (carrés ouverts,  $1 \times 10^{-8}$  M à  $1 \times 10^{-3}$  M), de NECA (cercles fermés,  $1 \times 10^{-7}$  à  $1 \times 10^{-3}$  M), de 2-CADO (triangles fermés,  $1 \times 10^{-7}$  à  $1 \times 10^{-3}$  M) ou de CGS21680 (losanges ouverts,  $1 \times 10^{-7}$  à  $1 \times 10^{-4}$  M) durant 5 minutes et l'évaluation du pourcentage de conversion de l' [ $^3$ H]-ATP en [ $^3$ H]-AMP cyclique est faite tel qu'indiqué dans la section matériel et méthodes. Les résultats sont exprimés en pourcentages de la réponse obtenue par 100  $\mu$ M d'adénosine. Chaque point représente la moyenne  $\pm$  l'erreur-type de 4 à 12 déterminations faites sur différentes préparations cellulaires.

**TABLEAU 5. Puissance et activité intrinsèque des différents analogues de l'adénosine sur les récepteurs A<sub>2B</sub>.**

	<i>Cellules épithéliales (Cobaye)</i>		<i>Cortex cérébral (Cobaye)<sup>2</sup></i>		<i>HEK293 (Homme)<sup>3</sup></i>		<i>CHO.A<sub>2B</sub> cells (Homme)<sup>1</sup></i>		<i>NIH 3T3 (Souris)<sup>4</sup></i>	
Agonistes	<i>Puissance (pD<sub>2</sub>)</i>	<i>Réponse maximale</i>	<i>Puissance (pD<sub>2</sub>)</i>	<i>Réponse maximale (%100μM NECA)</i>	<i>Puissance (pD<sub>2</sub>)</i>	<i>Réponse maximale (%100μM NECA)</i>	<i>Puissance (pD<sub>2</sub>)</i>	<i>Réponse maximale (%100μM NECA)</i>	<i>Puissance (pD<sub>2</sub>)</i>	<i>Réponse maximale (%100μM NECA)</i>
NECA	5.4 ± 0.2	100 %	5.91	100 %	5.24	100 %	5.91	100 %	6.33	-
2-CADO	4.9 ± 0.4	61 ± 9 % <sup>†</sup>	4.35	97 %	4.41	75 %	5.27	61 %	5.36	-
Adénosine	5.0 ± 0.1	75 ± 3 % <sup>**</sup>	3.99	71 %	4.19	79 %	5.69	32 %	-	-
CGS21680	inactif	inactif	inactif	inactif	inactif	inactif	inactif	inactif	inactif	inactif

Les valeurs représentent la moyenne ± s.e.m. de 4 à 8 déterminations faites à partir de préparations cellulaires différentes.

<sup>†</sup>P < 0.01, <sup>\*\*</sup> P < 0.001 vs NECA

<sup>1</sup> Alexander et al., (1996)

<sup>2</sup> Alexander et al., (1994)

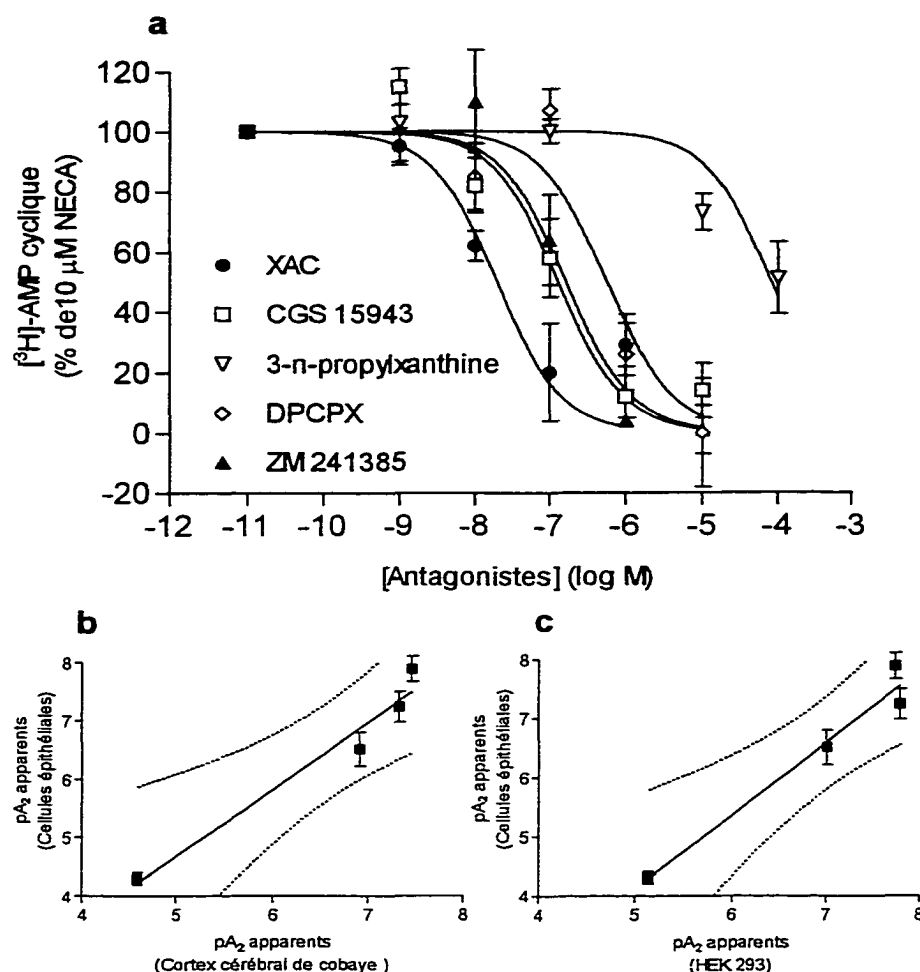
<sup>3</sup> Cooper et al., (1997)

<sup>4</sup> Brackett et al., (1994)



### **3.5.2. Effet des antagonistes des récepteurs à l'adénosine sur la génération d'AMP cyclique par les cellules épithéliales de la trachée de cobaye en culture induite par le NECA.**

L'effet stimulateur du NECA (à une concentration sous-maximale, mais plus grande que l' $EC_{50}$ ) sur la formation d'AMP cyclique est inhibé par la présence d'antagonistes sélectifs et non-sélectifs des récepteurs à l'adénosine, soit le XAC (non-sélectif  $A_1$ ,  $A_{2A}$  et  $A_{2B}$ ), le CGS15943 (non-sélectif  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$ ), le DPCPX (sélectif  $A_1$ ), le ZM241385 (sélectif  $A_{2A}$ ) et le 3-n-propylxanthine (sélectif  $A_{2B}$ ) (Figure 17A). L'ordre de puissance de ces antagonistes sur la génération d'AMP cyclique induite par le NECA est: XAC > CGS15943 > ZM241385 > DPCPX >> 3-n-propylxanthine. Les valeurs des  $pA_2$  apparents de ces antagonistes sont de  $7.9 \pm 0.2$ ,  $7.2 \pm 0.3$ ,  $6.7 \pm 0.1$ ,  $6.5 \pm 0.3$  et de  $4.3 \pm 0.1$  respectivement (Tableau 6). L'aminophylline possède un  $IC_{50}$  plus grand que 100  $\mu M$  ce qui rend particulièrement difficile la détermination de son  $pA_2$  apparent au niveau des cellules épithéliales de la trachée de cobaye (données non présentées).



**Figure 17.** Effet des différents antagonistes des récepteurs à l'adénosine sur la génération d'AMP cyclique induite par le NECA. a: Les cellules sont préincubées 15 min. en présence de  $10\ \mu\text{M}$  Rolipram (un inhibiteur sélectif de la phosphodiesterase IV) et en présence de concentrations croissantes de XAC (Cercles fermés,  $1 \times 10^{-9}$  à  $1 \times 10^{-5}$  M), CGS15943 (carrés ouverts,  $1 \times 10^{-9}$  à  $1 \times 10^{-5}$  M), 3-n-propylxanthine (triangles fermés,  $1 \times 10^{-9}$  à  $1 \times 10^{-5}$  M), DPCPX (losanges ouverts,  $1 \times 10^{-9}$  à  $1 \times 10^{-5}$  M) et le ZM241385 (triangles inversés et fermés,  $1 \times 10^{-9}$  à  $1 \times 10^{-5}$  M) et ensuite stimulées avec  $10\ \mu\text{M}$  de NECA durant 5 minutes. et l'évaluation du pourcentage de conversion de l'  $[^3\text{H}]\text{-ATP}$  en  $[^3\text{H}]\text{-AMP cyclique}$  est faite tel qu'indiqué dans la section matériel et méthodes. Les résultats sont exprimés en pourcentages de la réponse obtenue par  $10\ \mu\text{M}$  de NECA. Chaque point représente la moyenne  $\pm$  l'erreur-type de 4 à 8 déterminations faites sur différentes préparations cellulaires. b: Corrélation entre les valeurs de  $pA_2$  apparents observées sur les cellules épithéliales de la trachée de cobaye et celles observées au niveau du cortex cérébral de cobaye. c: comparaison entre les valeurs des  $pA_2$  apparents déterminées au niveau des cellules épithéliales de la trachée de cobaye et celles observées dans les cellules humaines HEK293.

**TABEAU 6. Valeurs des pA<sub>2</sub> apparents sur les récepteurs A<sub>2B</sub>.**

	<i>Cellules épithéliales (Cobaye)</i>	<i>Cortex cérébrale (Cobaye)</i>	<i>CHO.A<sub>2B4</sub> cells (Humain)</i>	<i>HEK 293 (Humain)</i>	<i>NIH 3T3 (souris)</i>
<i>Antagonistes</i>					
XAC	7.9 ± 0.2	7.46 <sup>2</sup>	7.89 <sup>1</sup>	7.74 <sup>3</sup>	8.19 <sup>4</sup>
CGS15943	7.2 ± 0.3	7.33 <sup>1</sup>	7.75 <sup>1</sup>	7.79 <sup>3</sup>	-
3-n-propylxanthine	4.3 ± 0.1	4.59 <sup>1</sup>	4.63 <sup>1</sup>	5.13 <sup>3</sup>	-
DPCPX	6.5 ± 0.3	6.91 <sup>1</sup>	7.16 <sup>1</sup>	7.01 <sup>3</sup>	7.76 <sup>4</sup>
ZM241385	6.7 ± 0.1	-	-	-	-

Les valeurs représentent la moyenne ± s.e.m. de 4 à 8 déterminations faites à partir de préparations cellulaires différentes.

<sup>1</sup> Alexander et al., (1997)

<sup>2</sup> Alexander et al., (1994)

<sup>3</sup> Cooper et al., (1997)

<sup>4</sup> Brackett et al., (1994)

pA<sub>2</sub> du ZM241385 observé sur d'autres préparation exprimant le récepteur A<sub>2B</sub>.

pA<sub>2</sub> = 5.95, Oreillette de cobaye (Poucher *et al.*, 1995)

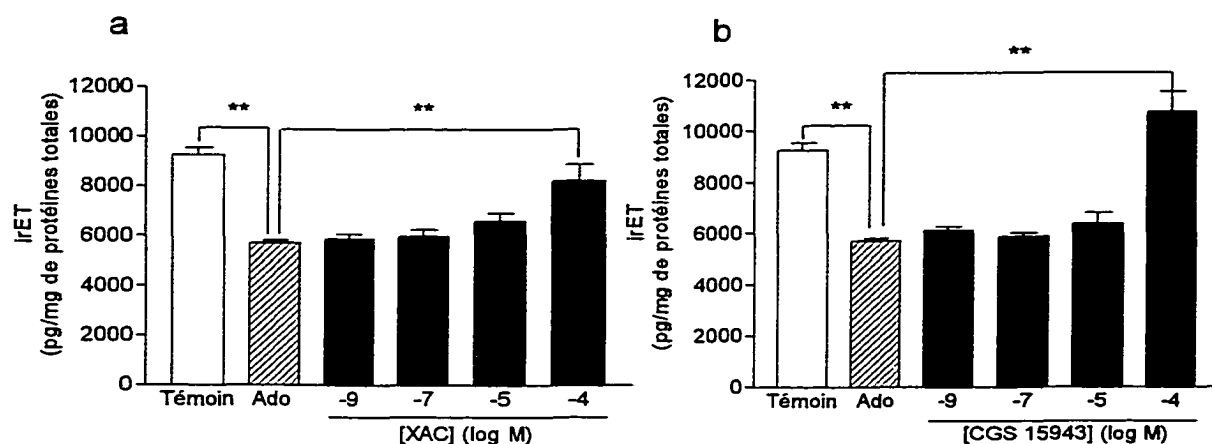
= 7.06, Aorte de cobaye (Poucher *et al.*, 1995)

= 5.69, Cortex de rat (essai de liaison) (Poucher *et al.*, 1995)

pA<sub>2</sub> du ZM241385 observé sur d'autres préparations exprimant le récepteur A<sub>2A</sub>

pA<sub>2</sub> = 9.52, rat PC12 (essai de liaison) (Poucher *et al.*, 1995)

pA<sub>2</sub> = 8.57, Coeur isolé de cobaye (Poucher *et al.*, 1995)



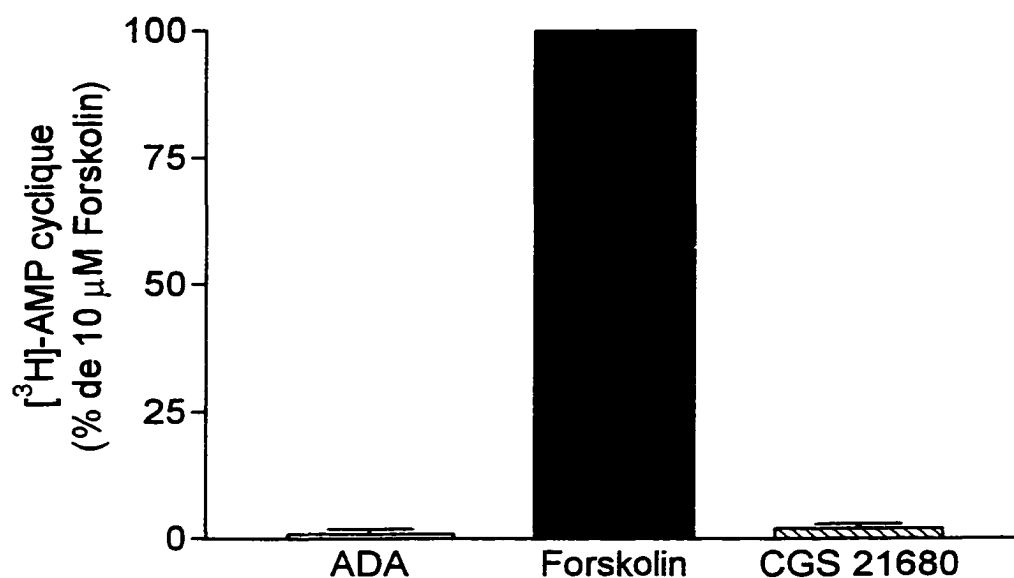
**Figure 18.** Effet de puissants antagonistes des récepteurs à l'adénosine sur l'inhibition de la production/sécrétion d'irET induite par l'adénosine. Les cellules épithéliales de la trachée de cobaye sont incubées 24 heures à 37°C en absence (colonnes ouvertes) ou en présence (colonnes hachurées) d'adénosine ( $1 \times 10^{-4}$  M) et en absence (Témoin) ou en présence de concentrations croissantes de a: XAC ( $1 \times 10^{-9}$  à  $1 \times 10^{-4}$  M), et b: CGS15943 ( $1 \times 10^{-9}$  à  $1 \times 10^{-4}$  M), et les niveaux d'irET sont mesurés tel qu'indiqué dans la section matériel et méthodes. Chaque colonne représente la moyenne  $\pm$  l'erreur-type de 4 déterminations faites sur différentes préparations cellulaires (\* $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ )

### **3.5.3. Effets du XAC et du CGS15943 sur l'inhibition de la production/sécrétion d'ET-1 par les cellules épithéliales de la trachée de cobaye en culture induite par l'adénosine.**

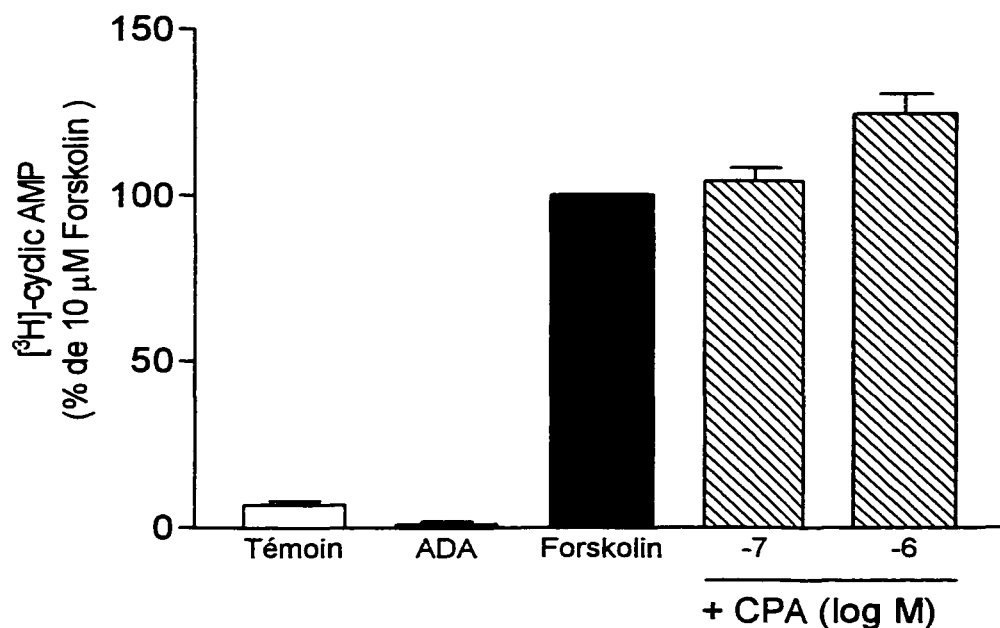
Puisque le XAC et le CGS15943 sont les deux antagonistes les plus puissants (Tableau 8, Figure 17A) et qu'il existe une étroite corrélation entre la formation d'AMP cyclique et l'inhibition de la production/sécrétion d'ET-1 (Figure 22B), ces deux antagonistes ont été utilisés afin de contrer l'effet inhibiteur de l'adénosine sur la production/sécrétion de l'ET-1 par les cellules épithéliales de la trachée de cobaye. De plus, le XAC et le CGS15943 ont été utilisés afin de s'assurer que l'effet inhibiteur de l'adénosine sur la production/sécrétion d'ET-1 par les cellules épithéliales de la trachée de cobaye soit dû à l'activation d'un récepteur à l'adénosine et non à un effet non spécifique de ce composé. Les résultats présentés à la figure 18 montrent que l'incubation des cellules en présence de XAC ( $1 \times 10^{-9}$  M à  $1 \times 10^{-4}$  M, Figure 18A) et le CGS15943 ( $1 \times 10^{-9}$  à  $1 \times 10^{-4}$  M, Figure 18B) renversent totalement l'effet inhibiteur de l'adénosine à de fortes concentrations ( $1 \times 10^{-4}$  M).

### **3.5.4. Autres récepteurs à l'adénosine**

Comme l'adénosine produit ses effets via plusieurs types de récepteurs, nous avons entrepris de déterminer s'il y avait présence d'autres récepteurs à l'adénosine sur l'épithélium de la trachée de cobaye. Puisque le récepteur  $A_1$  est généralement associé à



**Figure 19.** Identification d'un récepteur  $A_{2A}$  sur l'épithélium de la trachée de cobaye en culture. Les cellules sont préincubées 15 min. en présence de 10  $\mu$ M Rolipram (un inhibiteur sélectif de la phosphodiesterase IV) et d'adénosine déaminase (ADA, 1,5 U/ml) ensuite stimulées avec 10  $\mu$ M de CGS21680 ou 10  $\mu$ M forskolin durant 5 minutes et l'évaluation du pourcentage de conversion de l' [<sup>3</sup>H]- ATP en [<sup>3</sup>H]-AMP cyclique est faite tel qu'indiqué dans la section matériel et méthodes. Chaque point représente la moyenne  $\pm$  l'erreur-type de 4 déterminations faites sur différentes préparations cellulaires.

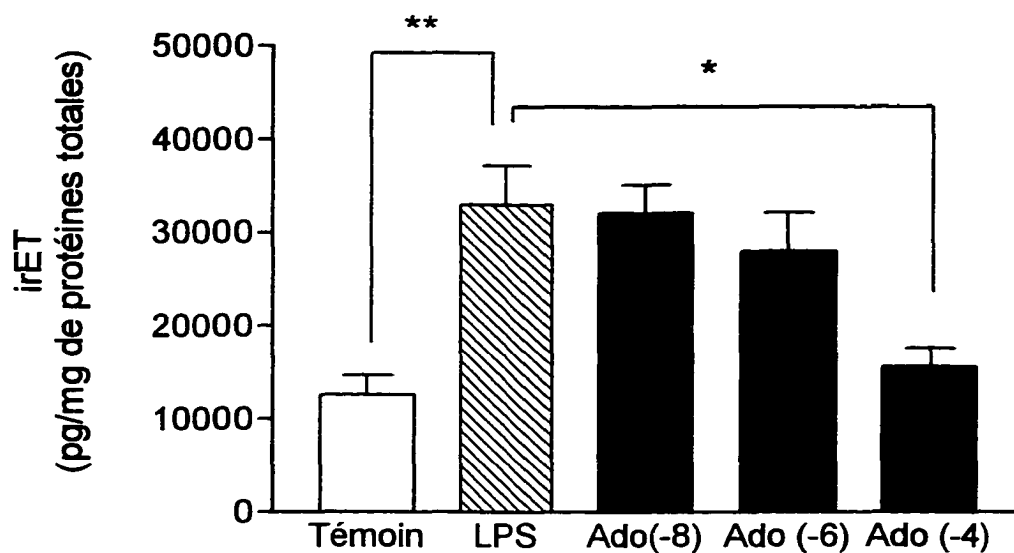


**Figure 20.** Identification d'un récepteur A<sub>1</sub> sur l'épithélium de la trachée de cobaye en culture. Les cellules sont préincubées 15 min. en présence de 10 μM Rolipram (un inhibiteur sélectif de la phosphodiesterase IV) (Témoin) et d'adénosine déaminase (ADA, 1,5 U/ml) et ensuite stimulées ou non avec 10 μM de forskolin ou en présence de forskolin et de CPA (+CPA 1X10<sup>-6</sup> et 1X10<sup>-7</sup> M) durant 5 minutes et l'évaluation du pourcentage de conversion de l' [<sup>3</sup>H]- ATP en [<sup>3</sup>H]-AMP cyclique est faite tel qu'indiqué dans la section matériel et méthodes. Chaque point représente la moyenne ± l'erreur-type de 4 déterminations faites sur différentes préparations cellulaires.

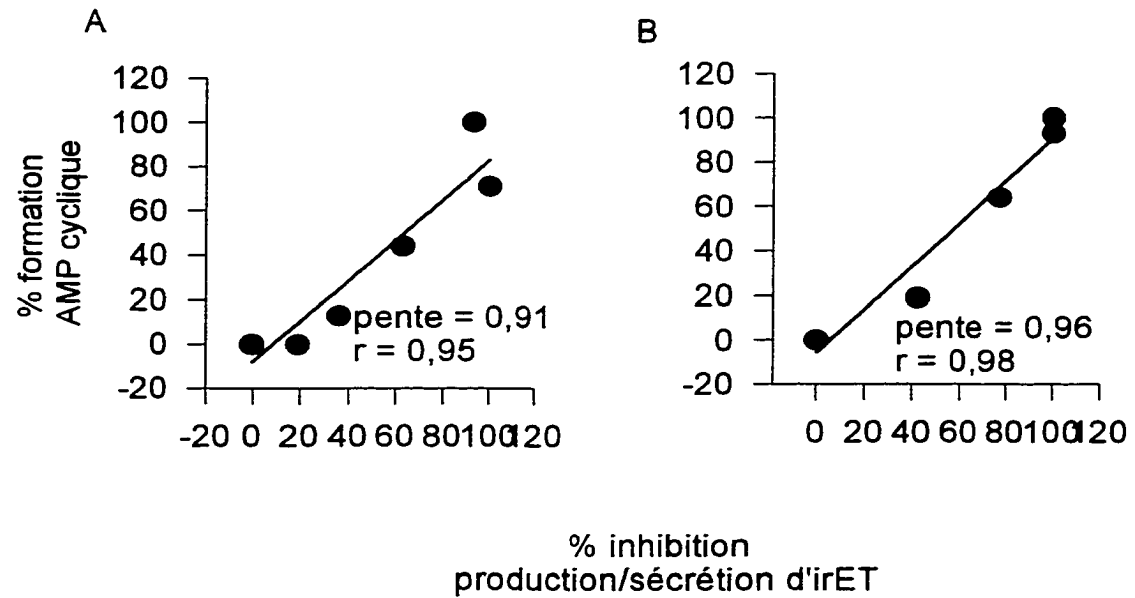
l'inhibition de l'adénylyl cyclase (Van Calker *et al.*, 1978; Londos *et al.*, 1980a; Freissmuth *et al.*, 1991; Munshi *et al.*, 1991), nous avons tenté de déterminer sa présence au niveau des cellules épithéliales. Pour ce faire, l'agoniste sélectif  $A_1$ , le CPA, a été utilisé et son effet sur la génération d'AMP cyclique induite par la forskolin a été évalué. De plus, afin de s'assurer que l'adénosine endogène n'influence ou ne camoufle ce récepteur, nous avons utilisé l'adénosine déaminase dans ces essais. D'abord, nos résultats montrent que la présence d'adénosine déaminase (ADA, 1.5 U/ml) inhibe la génération basale d'AMP cyclique de 15% ( $0.190 \pm 0.008$  % vs  $0.160 \pm 0.009$  %) comparativement aux valeurs observées en l'absence d'adénosine déaminase. En présence de forskolin (10  $\mu$ M) et d'adénosine déaminase (1,5 U/ml), la génération d'AMP cyclique par les cellules épithéliales de la trachée de cobaye est quadruplée, passant de  $0.160 \pm 0.009$  à  $0.619 \pm 0.058$  % de conversion. La présence de l'agoniste sélectif  $A_1$  (CPA) à des concentrations de  $1 \times 10^{-7}$  et  $1 \times 10^{-6}$  M (concentrations maximales sur le récepteur  $A_1$  à l'adénosine (Alexander *et al.*, 1994a)) amplifie la génération d'AMP cyclique induite par la forskolin (100 %) proportionnellement à la concentration de forskolin utilisée, soit de  $104 \pm 4\%$  et  $124 \pm 6\%$  (figure 20).

Afin de nous assurer que le récepteur  $A_{2A}$  ne soit pas camouflé par la présence d'adénosine endogène, les essais utilisant l'agoniste sélectif  $A_{2A}$  ont aussi été faits en présence d'adénosine déaminase. Nos résultats montrent que l'agoniste sélectif  $A_{2A}$ , le CGS21680 (10  $\mu$ M, concentration maximale sur le récepteur  $A_{2A}$ ), est sans effet sur la génération d'AMP cyclique lorsque les cellules sont prétraitées avec l'adénosine déaminase (figure 19).





**Figure 21.** Effet de l'adénosine sur la production/sécrétion stimulée d'irET par les cellules épithéliales de la trachée de cobaye. Les cellules épithéliales sont mises en présence (LPS) ou en absence (Témoin) de LPS (10  $\mu\text{g/ml}$ ) durant 24 heures à 37°C et stimulées avec des concentrations croissantes d'adénosine ( $1 \times 10^{-8}$  à  $1 \times 10^{-4}$  M) 30 min. Les niveaux d'irET sont mesurés tel qu'indiqué dans la section matériel et méthodes. Chaque colonne représente la moyenne de 4 à 12 déterminations faites sur différentes préparations cellulaires (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ).



**Figure 22.** Corrélation entre la formation d'AMP cyclique et l'inhibition de la production d'irET par les cellules épithéliales de la trachée de cobaye. A: Corrélation entre l'effet inhibiteur et stimulateur de la PGE2 et B: Corrélation entre l'effet stimulateur et inhibiteur de l'adénosine.

### **3.6. EFFET DE L'ADÉNOSINE SUR LA PRODUCTION/SÉCRÉTION d'irET STIMULÉE PAR LE LPS.**

Dans des travaux antérieurs, nous avons déjà démontré que la production/sécrétion d'irET par les cellules épithéliales de la trachée de cobaye est augmentée en présence d'agents pro-inflammatoires tels que les lipopolysaccharides (LPS) et l'interleukine-1 $\beta$  (Yang *et al.*, 1997; Pelletier *et al.*, 1998). Dans la présente étude, nos résultats montrent que la présence de LPS (10 $\mu$ g/ml) durant 24 heures stimule la production/sécrétion d'irET par les cellules épithéliales en culture d'un facteur 3 (figure 21). En présence d'adénosine (1X10<sup>-8</sup>, 1X10<sup>-6</sup> et 1X10<sup>-4</sup> M), l'effet stimulateur du LPS sur la production d'irET par les cellules épithéliales est renversé en fonction de la concentration utilisée. La production stimulée d'irET est presque entièrement renversée par l'adénosine à une concentration de 1 X 10<sup>-4</sup> M (P< 0.05) tandis qu'à une concentration de 1X10<sup>-6</sup> et 1X10<sup>-8</sup> M, l'adénosine ne produit aucun ou peu d'effet sur la production/sécrétion d'irET (figure 21).

### **3.7. CORRÉLATION ENTRE LA FORMATION D'AMP CYCLIQUE ET L'INHIBITION DE LA PRODUCTION D'ET-1 PAR LA PROSTAGLANDINE E<sub>2</sub> ET L'ADÉNOSINE**

L'effet inhibiteur de la prostaglandine E<sub>2</sub> sur la production d'irET et son effet stimulateur sur la formation d'AMP cyclique au niveau des cellules épithéliales sont deux

phénomènes se produisant à des concentrations relativement semblables. Une droite de corrélation entre les deux phénomènes est présentée à la figure 22A. En exprimant le pourcentage de formation d'AMP cyclique à chacune des concentrations de  $\text{PGE}_2$  utilisées en fonction du pourcentage d'inhibition de la production d'ET-1 observé pour chacune des concentrations de  $\text{PGE}_2$  utilisées, une droite de corrélation a été tracée dont la pente est de 0,91 et le coefficient de corrélation (  $r$  ) est de 0,95. Dans le cas de l'adénosine, des résultats semblables sont observés. Une droite de régression mettant en relation les effets inhibiteurs de l'adénosine sur la production/sécrétion d'irET et l'effet stimulateur de cette dernière sur la formation d'AMP cyclique possède une pente de 0,96 et un coefficient de corrélation (  $r$  ) de 0,98 (figure 22B).

## DISCUSSION

Dans ce mémoire, nous avons entrepris de caractériser les récepteurs de la prostaglandine  $E_2$  et de l'adénosine qui sont responsables de l'inhibition de la production/sécrétion d'ET-1.

### 4.1. PRODUCTION/SÉCRÉTION D'ET PAR LES CELLULES ÉPITHÉLIALES DE LA TRACHÉE DE COBAYE EN CULTURE.

Les résultats présentés ici indiquent que les cellules épithéliales de la trachée de cobaye produisent et sécrètent au moins une des trois isoformes d'endothéline. Cette libération se fait de façon constante et est maintenue pour une période d'au moins 24 heures. De plus, l'isoforme d'endothéline produite et sécrétée par les cellules épithéliales de la trachée de cobaye a été analysée par HPLC et reconnue comme étant l'ET-1 (Yang *et al.*, 1997). La production et la sécrétion d'endothéline-1 par les cellules épithéliales des voies aériennes ont déjà été rapportées par plusieurs groupes de recherche (Walters E.H. & Davies, 1982; Black *et al.*, 1989; Vittori *et al.*, 1992; Rennick *et al.*, 1993; Calderon *et al.*, 1994; Markewitz *et al.*, 1995; Laporte *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1997). De plus, différentes isoformes d'endothélines au niveau de l'épithélium ont été observées et sont l'ET-1 et l'ET-3 chez le chien et l'ET-1 chez le cobaye (Walters E.H. & Davies, 1982; Black *et al.*, 1989). La production et la sécrétion d'ET-1 ont été observées sur d'autres types cellulaires comme les cellules endothéliales de différents lits vasculaires (Durieu-

Trautman *et al.*, 1993; Prins *et al.*, 1994; Razandi *et al.*, 1996), les cellules mésangiales (Sakamoto *et al.*, 1992), les cellules thyroïdiennes (Varnio *et al.*, 1996) et, finalement, les macrophages alvéolaires (Ninomiya *et al.*, 1992).

#### **4.2. EFFET DE LA PROSTAGLANDINE E<sub>2</sub> ET DE L'ADÉNOSINE SUR LA PRODUCTION/SÉCRÉTION BASALE D'irET PAR LES CELLULES ÉPITHÉLIALES DE LA TRACHÉE DE COBAYE.**

L'objectif de la première partie de ce mémoire a été de déterminer les effets de deux médiateurs, soit l'adénosine et la PGE<sub>2</sub>, sur la production/sécrétion d'irET. La PGE<sub>2</sub> est connue comme étant un médiateur bronchoprotecteur, tandis que l'adénosine semble être impliquée dans la pathophysiologie de l'asthme (Church *et al.*, 1983; Hughes *et al.*, 1984; Peachell *et al.*, 1988; Feoktistov & Biaggioni, 1995; Feoktistov & Biaggioni, 1997) et la bronchoconstriction (Nyce & Metzger, 1997; Ali *et al.*, 1997).

Nos résultats indiquent que la PGE<sub>2</sub> et l'adénosine diminuent la production/sécrétion de l'ET-1 en fonction de la concentration utilisée, suggérant ainsi la présence de récepteurs pour la prostaglandine E<sub>2</sub> et pour l'adénosine sur les cellules épithéliales de la trachée de cobaye, dont l'une des fonction pourrait être d'inhiber la production d'ET-1. Plusieurs auteurs ont démontré que la production et/ou la sécrétion de l'endothéline au niveau de l'épithélium des voies aériennes pouvaient être modulées par certains agents tels que les glucocorticoïdes (Calderon *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1997) et, bien entendu, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE) (Yang *et*

*al.*, 1997; Pelletier *et al.*, 1998). À l'opposé, certaines cytokines et des stimuli pro-inflammatoires sont responsables de l'augmentation de la production et de la sécrétion de l'ET-1 par l'épithélium (Yang *et al.*, 1997; Pelletier *et al.*, 1998). Jusqu'à présent, aucune étude n'a rapporté cet effet inhibiteur de la PGE<sub>2</sub> ni de l'adénosine sur la production de l'ET-1 par les cellules épithéliales des voies aériennes. Par contre, l'effet inhibiteur de la PGE<sub>2</sub> sur la production et la sécrétion de l'ET-1 a été observé au niveau des cellules endothéliales de l'aorte bovine où cette dernière et la prostacyclin diminuent la production/sécrétion de l'ET-1 stimulée par le sérum bovin foetal selon une voie dépendante du GMP cyclique et de la protéine kinase GMP cyclique dépendante (PKG) (Prins *et al.*, 1994; Razandi *et al.*, 1996). En ce qui a trait à l'adénosine, son effet sur la production/sécrétion d'ET-1 a été rapporté au niveau des cellules thyroïdiennes de rat, dans laquelle l'adénosine stimule la production d'ET-1 via l'activation d'un récepteur A<sub>1</sub> et d'une voie de signalisation impliquant la protéine kinase C (PKC) (Vanio *et al.*, 1996).

#### **4.3. CARACTÉRISATION DU RÉCEPTEUR DE LA PROSTAGLANDINE E<sub>2</sub> SUR LES CELLULES ÉPITHÉLIALES DE LA TRACHÉE DE COBAYE.**

##### **4.3.1. Récepteur de la PGE<sub>2</sub> au niveau des cellules épithéliales de la trachée de cobaye.**

Comme plusieurs des effets inhibiteurs de la prostaglandine E<sub>2</sub> sont produits par la stimulation d'un ou de plusieurs récepteurs couplés à une protéine régulatrice de type G,

(Coleman *et al.*, 1994), nous avons évalué l'effet de la  $\text{PGE}_2$  sur la production d'AMP cyclique. Nos résultats démontrent que la prostaglandine  $\text{E}_2$  stimule la formation d'AMP cyclique en fonction de la concentration utilisée et du temps. De plus, une étroite corrélation est observée entre la formation d'AMP cyclique et l'inhibition de la production de l'ET-1 par les cellules épithéliales de la trachée de cobaye, ce qui suggère que les deux phénomènes sont reliés. De plus, une autres étude a permis de mettre en relation l'implication de l'AMP cyclique dans l'inhibition de la production/sécrétion d'ET-1. Dans cette dernière, des analogues de l'AMP cyclique, la Forskolin et des agonistes  $\beta$ -adrénergiques inhibent la production d'ET-1 (voir section 4.6 pour plus de détails).

Puisque nos résultats permettent de mettre en relation la formation d'AMP cyclique et l'inhibition de la production/sécrétion de l'ET-1, la caractérisation du récepteur aux prostaglandines responsable de la formation d'AMP cyclique induite par la  $\text{PGE}_2$  a été entreprise. Nos observations démontrent que la  $\text{PGE}_2$  stimule la formation d'AMP cyclique tandis que la  $\text{PGI}_2$ , la  $\text{PGD}_2$  et la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  semblent totalement inefficaces aux concentrations observées. L'ordre de puissance des agonistes naturels sur la formation d'AMP cyclique est :  $\text{PGE}_2 \gg \text{iloprost}, \text{PGF}_{2\alpha}, \text{PGD}_2$ . Cet ordre de puissance suggère que seul un récepteur de la famille EP est responsable de la formation d'AMP cyclique puisqu'aucun autre agoniste naturel ne permet de stimuler la formation d'AMP cyclique par les cellules épithéliales de la trachée de cobaye. Ces observations sont en accord avec la classification des récepteurs aux prostaglandines (Coleman *et al.*, 1994).

Tel que mentionné dans l'introduction, il existe quatre sous-types de récepteurs EP. Les récepteurs  $\text{EP}_2$  et  $\text{EP}_4$  sont généralement couplés à une protéine régulatrice de



type  $G_s$ , ce qui conduit à l'activation de l'adénylyl cyclase (de Brum-Fernandes *et al.*, 1996; Nishigaki *et al.*, 1996; Murrat & Ashby, 1997). Le récepteur  $EP_1$  est généralement couplé à une protéine régulatrice de type  $G_{q/11}$  (Creese & Denborough, 1981; Coleman & Kennedy, 1985; Coleman *et al.*, 1994) et le récepteur  $EP_3$  semble être couplé à plusieurs protéines régulatrices  $G$ , ce qui permet l'activation de plusieurs seconds messagers (Irie *et al.*, 1993; Namba *et al.*, 1993; Breyer *et al.*, 1994; Jon *et al.*, 1997). Afin de distinguer le ou les types de récepteurs EP présents sur l'épithélium de la trachée de cobaye, quatre analogues de la  $PGE_2$ , soit le 16,16-diméthyl  $PGE_2$ , le 11-deoxy  $PGE_1$ , l'iloprost et le butaprost ainsi que la  $PGE_2$  ont été utilisés.

L'ordre de puissance de ces agonistes sur le récepteur couplé de façon positive à l'adénylyl cyclase exprimé dans les cellules épithéliales de la trachée de cobaye est  $PGE_2 > 16,16\text{-diméthyl } PGE_2 > 11\text{-deoxy } PGE_1 >>> \text{Iloprost, butaprost}$ . Cet ordre de puissance est en accord avec deux études antérieures dans lesquelles le récepteur  $EP_4$  de souris exprimé dans les cellules CHO a été caractérisé par essais de liaisons (Kiriyaama *et al.*, 1997) et le récepteur  $EP_4$  au niveau des chondrocytes bovins a été caractérisé par essais fonctionnels (de Brum-Fernandes *et al.*, 1996). Les résultats des travaux de Kiriyaama *et al.*, (1997) permettent aussi de mettre en évidence un ordre de puissance différent pour ces agonistes sur les divers récepteurs de la famille EP. Sur le récepteur  $EP_1$ , l'ordre de puissance de ces agonistes est  $PGE_2 = \text{Iloprost} >>> 11\text{-deoxy } PGE_1 >> 16,16\text{-diméthyl } PGE_2, \text{ Butaprost}$ . Les ordres de puissance de ces agonistes sont aussi différents pour les récepteurs  $EP_2$  et  $EP_3$ . Ces ordres de puissances sont:  $PGE_2 \geq 16,16\text{-diméthyl } PGE_2 > 11\text{-deoxy } PGE_1 > \text{butaprost} >>> \text{Iloprost}$  et  $PGE_2 \geq 11\text{-deoxy } PGE_1 = 16,16\text{-diméthyl}$

$\text{PGE}_2 > \text{Iloprost} \gg \text{butaprost}$  (Kiriya *et al.*, 1997). Des résultats semblables ont été observés sur les chondrocytes bovins (de Brum-Fernandes *et al.*, 1996) et sur les cellules BHK exprimant le récepteur  $\text{EP}_4$  (Marshall *et al.*, 1997). De plus, l'incapacité du butaprost à stimuler la génération d'AMP cyclique par les cellules épithéliales de la trachée de cobaye confirme l'absence du récepteur  $\text{EP}_2$  ou la très faible expression de ce dernier au niveau des cellules épithéliales de la trachée de cobaye.

Tel que mentionné dans la section RÉSULTATS, le AH6809, un antagoniste des récepteurs DP et  $\text{EP}_1$  est aussi un antagoniste du récepteur  $\text{EP}_2$ , mais il possède une faible affinité pour ce type de récepteur (Woodward *et al.*, 1995; Kiriya *et al.*, 1997; Marshall *et al.*, 1997). Puisque les cellules épithéliales de la trachée de cobaye ne semblent pas exprimer de récepteur DP ou de récepteur  $\text{EP}_1$  couplé à l'activation de l'adénylyl cyclase, le AH6809 est utilisé afin de confirmer les effets observés par l'agonistes  $\text{EP}_2$ , le butaprost, soit que le récepteur  $\text{EP}_2$  n'est pas exprimé ou qu'il l'est faiblement au niveau des cellules épithéliales. La présence du AH6809 ne déplace pas la courbe concentration-réponse de la  $\text{PGE}_2$  vers la droite mais, à l'inverse, augmente légèrement, et de façon non significative, la réponse de la  $\text{PGE}_2$ . Les résultats obtenus avec cet antagoniste confirment ceux observés par le profil des agonistes, soit que le récepteur  $\text{EP}_2$  n'est pas exprimé à la surface des cellules épithéliales de la trachée de cobaye ou l'est très peu.

Le groupe de Coleman *et al.*, (1994) a démontré que l'effet de la  $\text{PGE}_2$  sur le récepteur  $\text{EP}_4$  est inhibé par deux antagonistes sélectifs, soit le AH23848B et le AH22921X (Coleman *et al.*, 1994). Nos résultats indiquent que ces deux antagonistes

déplacent, vers la droite et d'une façon dépendante de la concentration utilisée, la courbe concentration-réponse de la PGE<sub>2</sub> sur la formation d'AMP cyclique par les cellules épithéliales. Ces observations suggèrent que le récepteur EP<sub>4</sub> est exprimé et fonctionnel sur l'épithélium de la trachée de cobaye et qu'il est responsable de transmettre l'effet de la prostaglandine E<sub>2</sub> sur la génération d'AMP cyclique. Cependant, nos résultats ne permettent pas de déterminer la nature de ces deux antagonistes puisque les effets maximaux ne sont pas atteints, que les antagonistes soient présents ou non. De plus, il nous est impossible de conclure à un effet non compétitif des antagonistes AH23848B ou AH22921X puisque les conditions expérimentales, permettant de conclure à ce type d'inhibition n'ont pu être respectées (Kenakin, 1987).

Afin de confirmer que le récepteur responsable de l'augmentation d'AMP cyclique est aussi responsable de l'inhibition de la production/sécrétion d'irET, des essais utilisant le AH23848B ont été effectués afin de renverser l'effet inhibiteur de la PGE<sub>2</sub>. Nos résultats démontrent que le AH23848B, à de relativement faibles concentrations (10 µM), renverse l'effet inhibiteur de la PGE<sub>2</sub> sur la production/sécrétion d'irET par les cellules épithéliales de la trachée de cobayes suggérant ainsi que ce phénomène peut être produit par l'activation du récepteur EP<sub>4</sub>.

#### **4.3.2. Comparaison avec d'autres récepteurs de la prostaglandine E<sub>2</sub> du type EP<sub>4</sub>.**

L'agoniste non sélectif, la PGE<sub>2</sub>, semble être le plus puissant des agonistes EP sur les différents récepteurs EP<sub>4</sub> étudiés jusqu'à présent (Coleman *et al.*, 1994; Woodward *et*

*al.*, 1995; de Brum-Fernandes *et al.*, 1996; Kiriyaama *et al.*, 1997; Marshall *et al.*, 1997). Bien que les agonistes utilisés dans la présente études et dans les études antérieures ne correspondent pas à tous égards, il reste néanmoins que l'agoniste sélectif EP<sub>2</sub> butaprost est totalement inactif sur la génération d'AMP cyclique avec un pD<sub>2</sub> > 5 (de Brum-Fernandes *et al.*, 1996) et possède une très faible affinité sur ce type de récepteur, lorsque déterminée par essais de liaison (Kiriyaama *et al.*, 1997; Marshall *et al.*, 1997). Le 11-deoxy PGE<sub>1</sub> stimule aussi l'adényl cyclase, mais demeure moins puissant que la PGE<sub>2</sub> au niveau des chondrocytes bovins (de Brum-Fernandes *et al.*, 1996). Des résultats concordants ont été observés par le groupe de Kiriyaama *et al.*, (1997), puisque le 11-deoxy PGE<sub>2</sub> semble posséder 10 fois moins d'affinité que la PGE<sub>2</sub>.

Certaines études ont rapporté l'existence d'un récepteur EP couplé de façon positive à l'Adényl cyclase sans que ce récepteur soit activé par l'agoniste sélectif EP<sub>2</sub>, le butaprost (De Vries *et al.*, 1995; de Brum-Fernandes *et al.*, 1996). Ces deux études ont aussi montré que l'antagoniste sélectif EP<sub>4</sub>, le AH23848B, a la capacité de déplacer la courbe concentration-réponse de la PGE<sub>2</sub> sur la formation d'AMP cyclique vers la droite, mais la nature de l'antagoniste demeure nébuleuse. Le groupe de de Brum-Fernandes *et al.* (1996) ne tire aucune conclusion concernant la nature de l'antagoniste pour des raisons semblables aux nôtres. Le groupe de De Vries *et al.* (1995) propose la découverte d'un nouveau type de récepteur aux prostaglandines puisque la nature de l'antagoniste AH23848B correspond à celle d'un antagoniste non-compétitif. Depuis, cet antagoniste soulève la controverse. Dans certains modèles, le AH23848B agit comme antagoniste et possède aussi une activité agoniste partielle (Koremu *et al.*, 1997; Wise, 1998). Dans

notre étude, cette activité agoniste partielle, à de fortes concentrations, a aussi été observée lorsque cet agent est utilisé à long terme (production/sécrétion d'irET, 24h.) tandis qu'à court terme (inhibition de la formation d'AMP cyclique induite par la PGE<sub>2</sub>, 15 min.), il demeure antagoniste. Il est possible que l'activité agoniste partielle de ce composé soit due à la présence d'une autre population de récepteurs ou simplement à une transformation chimique du composé puisque ce phénomène semble être observé uniquement à long terme. L'activité agoniste de ce composé a été rapportée par quelques études (Koremu *et al.*, 1997; Wise, 1998) dans lesquelles de fortes concentrations (30 µM) inhibaient de façon significative la production de TNFα induite par le LPS et l'aggrégation des neutrophiles. Par contre, le type de récepteur présent sur ces types cellulaires semble être différent du récepteur EP<sub>4</sub> ou exprime plusieurs sous-types de récepteurs, ce qui rend la compréhension plus difficile. En ce qui concerne l'antagoniste AH22921X, seule l'étude de Coleman *et al.*, (1994) a rapporté son effet sur le récepteur EP<sub>4</sub> et il en a été discuté précédemment. Néanmoins, l'effet de ce composé suggère fortement la présence du récepteur EP<sub>4</sub> au niveau des cellules épithéliales de la trachée de cobaye.

#### **4.4. CARACTÉRISATION DU RÉCEPTEUR À L'ADÉNOSINE SUR LES CELLULES ÉPITHÉLIALES DE LA TRACHÉE DE COBAYE.**

La caractérisation des récepteurs A<sub>2B</sub> est généralement effectuée par essais fonctionnels. Tel que mentionné dans l'introduction, les récepteurs A<sub>2</sub> (A<sub>2A</sub> et A<sub>2B</sub>) sont

généralement associés à la stimulation de la génération d'AMP cyclique tandis que les récepteurs  $A_1$  et  $A_3$  sont principalement couplés à l'inhibition de l'activité de l'adénylyl cyclase (Fredholm *et al.*, 1994; Feoktistov & Biaggioni, 1995; Alexander *et al.*, 1996; Cooper *et al.*, 1997).

#### 4.4.1. Récepteur à l'adénosine sur les cellules épithéliales de la trachée de cobaye.

Les résultats présentés dans ce mémoire démontrent que l'adénosine stimule la génération d'AMP cyclique ce qui suggère la présence d'un récepteur de type  $A_2$ . L'ordre de puissance des analogues de l'adénosine sur la génération d'AMP cyclique, NECA > adénosine  $\geq$  2CADO >>> CGS21680, suggère fortement que le récepteur présent sur l'épithélium des voies aérienne soit du type  $A_{2B}$  et non  $A_{2A}$  puisque l'agoniste sélectif  $A_{2A}$ , le CGS21680 (Lupica *et al.*, 1990; Feoktistov & Biaggioni, 1993), demeure inefficace à stimuler l'adénylyl cyclase. De plus, le NECA possède une activité intrinsèque plus élevée que l'adénosine et le 2-CADO. Ceci a aussi été observé dans différentes études sur la caractérisation de ce type de récepteur (Alexander *et al.*, 1996, Cooper *et al.*, 1997, Hernandez *et al.*, 1993, Peakman & Hill, 1994). Deux explications peuvent expliquer ce phénomène. Le NECA peut être un agoniste complet et, en revanche, l'adénosine et le 2-CADO sont des agonistes partiels. Une autre raison peut être que le NECA possède un autre site de liaison lui permettant aussi d'activer la génération d'AMP cyclique. Ainsi des études de liaison devraient être entamées afin de s'assurer de la nature de cet agoniste.

Une conclusion semblable est tirée lorsque l'on s'attarde à l'ordre de puissance des antagonistes et leur  $pD_2$  apparent. La haute affinité observée pour l'antagoniste non sélectif  $A_1$  et  $A_2$ , le XAC, sur la génération d'AMP cyclique induite par le NECA indique que le récepteur présent n'est pas du type  $A_3$  puisque ce dernier montre une très faible affinité pour les dérivés xanthines (Fredholm *et al.*, 1994; Alexander *et al.*, 1996; Cooper *et al.*, 1997). De plus, la relativement haute affinité de l'antagoniste non-sélectif  $A_{2A}$ - $A_{2B}$ , le CGS15943 (Alexander *et al.*, 1996; Cooper *et al.*, 1997), confirme la présence d'un récepteur de la famille  $A_2$  présent sur les cellules épithéliales de la trachée de cobaye. Bien que de faible affinité, l'antagoniste sélectif  $A_{2B}$ , le 3-n-propylxanthine, inhibe aussi la génération d'AMP cyclique induite par le NECA. Concernant les antagonistes sélectifs  $A_{2A}$ , le ZM241385, et  $A_1$ , le DPCPX, ces deux antagonistes possèdent de faibles affinités en comparaison de celles observées sur leur récepteurs respectifs (Bruns *et al.*, 1987; Fredholm *et al.*, 1994; Poucher *et al.*, 1995). L'ordre de puissance ( $XAC \geq CGS15943 > ZM241385 > DPCPX > 3\text{-n-propylxanthine}$ ) et les affinités apparentes de ces antagonistes correspondent fortement aux valeurs observées par d'autres groupes de recherche et sont caractéristiques des récepteur  $A_{2B}$  (Fredholm *et al.*, 1994; Feoktistov & Biaggioni, 1995; Alexander *et al.*, 1996; Cooper *et al.*, 1997; Feoktistov & Biaggioni, 1997).

Afin de confirmer que le récepteur responsable de l'augmentation d'AMP cyclique est aussi responsable de l'inhibition de la production/sécrétion d'irET, des essais utilisant le XAC et le CGS15943, les deux antagonistes les plus puissants sur le récepteur  $A_{2B}$ , ont été effectués afin de renverser l'effet inhibiteur de l'adénosine. Nos résultats démontrent que ces deux derniers composés renversent l'effet de l'adénosine sur la

production/sécrétion du peptide suggérant ainsi que ce phénomène peut être produit par l'activation du récepteur  $A_{2B}$ . Certes, des concentrations d'antagoniste élevées ont été requises afin de renverser en totalité l'effet de l'adénosine puisque que cette dernière est utilisée à une concentration produisant un effet maximal, rendant difficile l'utilisation d'antagonistes. De plus, une autre explication peut être apportée quand à l'utilisation de fortes concentrations d'antagonistes. Les temps de demi-vie de ces composés (XAC et CGS15943) ne sont pas connus. Celui de l'adénosine ne l'est pas plus. Ainsi la durée de vie de l'adénosine peut être plus long que celles des antagonistes et ainsi produire un effet soutenu, que les antagonistes ne pourrait contrer à cause de leur absence à long terme.

#### **4.4.2. Comparaison avec d'autres récepteurs $A_{2B}$ à l'adénosine.**

L'agoniste non-sélectif, le NECA, est le plus puissant des agonistes utilisés avec un  $pD_2$  de 5.13. C'est aussi ce qui a été observé dans d'autres études où on a relevé des valeurs de 5.9 dans les cellules CHO exprimant le récepteur  $A_{2B}$  et le cortex cérébral de cobaye (Alexander *et al.*, 1996), de 5.29 dans les HEK 293 (Cooper *et al.*, 1997), de 6.22 au niveau du cervelet de cobaye (Hernandez *et al.*, 1993), de 6.0 au niveau des astrocytes de rat (Peakman & Hill, 1994) et de 5.6 au niveau des cellules HEL (Feoktistov & Biaggioni, 1993). Des résultats semblables ont été observés pour l'agoniste naturel et non-sélectif, l'adénosine, et le 2CADO soit 4.19 et 4.41 au niveau des HEK 293 (Cooper *et al.*, 1997), 5.69 et 5.27 au niveau des CHO exprimant le récepteur  $A_{2B}$  de 3.99 et 4.35 au niveau le cortex cérébrale de cobaye (Alexander *et al.*, 1996) et de 4.88 et



5.22 au niveau du cervelet de cobaye (Hernandez *et al.*, 1993). Quant au CGS 21680, toutes les études caractérisant le récepteur A<sub>2B</sub> ont démontré que cet agoniste sélectif du récepteur A<sub>2A</sub> ne possédait aucune activité à des concentrations allant jusqu'à 10µM (Hernandez *et al.*, 1993; Peakman & Hill, 1994; Alexander *et al.*, 1994b; Alexander *et al.*, 1996; Cooper *et al.*, 1997).

L'antagoniste non-sélectif, le XAC, est le plus puissant des antagonistes utilisés avec un pA<sub>2</sub> de 7.89. C'est aussi ce qui a été observé dans plusieurs autres études qui ont caractérisé le récepteur A<sub>2B</sub>. Au niveau des astrocytes de rat, le pA<sub>2</sub> du XAC est de 7.92 (Peakman & Hill, 1994), de 7.74 au niveau des cellules HEK 293 (Cooper *et al.*, 1997), de 7.89 au niveau des cellules CHO exprimant le récepteur A<sub>2B</sub> et de 7.46 au niveau du cortex cérébral de cobaye (Alexander *et al.*, 1996). En ce qui a trait au CGS15943, les pA<sub>2</sub> observés sur le récepteur A<sub>2B</sub> au niveau des cellules CHO, du cortex cérébral de cobaye, des cellules HEK 293 et des fibroblastes (NIH 3T3) sont de 7.75, 7.33, 7.79 et de 6.52 (Brackett & Daly, 1994; Alexander *et al.*, 1996; Cooper *et al.*, 1997) comparativement à 7.24 au niveau des cellules épithéliales de la trachée de cobaye. L'enprofylline (3-n-propylxanthine), possède un pA<sub>2</sub> de 4.30 au niveau des cellules épithéliales de la trachée de cobaye comparativement à 5.13 au niveau des cellules HEK 293, de 4.59 au niveau du récepteur A<sub>2B</sub> exprimé dans les cellules CHO et de 4.63 au niveau du cortex cérébral de cobaye (Alexander *et al.*, 1996; Cooper *et al.*, 1997). L'antagoniste ZM241385 possède un pA<sub>2</sub> apparent de 6.69 au niveau de l'épithélium des voies aériennes de cobaye comparativement à 5.69 sur le cortex cérébral de rat, à 5.95 au niveau de l'oreillette de cobaye et à 7.06 au niveau de l'aorte de cobaye (Poucher *et al.*,

1995). Enfin, les valeurs des  $pA_2$  apparents du DPCPX sur les autres récepteurs  $A_{2B}$  sont de 6.91 dans le cortex cérébral de cobaye, de 7.16 dans les cellules CHO. $A_{2B4}$  et de 7.01 sur les cellules HEK 293 (Alexander *et al.*, 1996; Cooper *et al.*, 1997) comparativement à 6.51 au niveau des cellules épithéliales de la trachée de cobaye. Ces résultats suggèrent fortement la présence d'un récepteur de type  $A_{2B}$  présent au niveau de l'épithélium de la trachée de cobaye.

Nos résultats et ceux obtenus par le groupe d'Alexander *et al.*, (1994 et 1997) montrent une étroite corrélation entre les valeurs des  $pA_2$  des antagonistes utilisés puisqu'une droite de corrélation des valeurs des  $pA_2$  apparents déterminées au niveau des cellules épithéliales de la trachée de cobaye et celles déterminées au niveau du cortex cérébral présente une pente est de 1.13 et un coefficient de corrélation (  $r$  ) de 0.98 (Figure 17B, principale). Ce qui suggère une grande similitude entre ces deux récepteurs.

Une étroite corrélation existe aussi entre les valeurs de  $pA_2$  apparents des antagonistes déterminées dans nos travaux et celles obtenues par le groupe de Cooper *et al.*, (1997). Une droite de corrélation entre les valeurs de  $pA_2$  apparents déterminée au niveau des cellules épithéliales de la trachée de cobaye et celles déterminées au niveau des cellules HEK 293 présente une pente est de 1,23 et un coefficient de corrélation (  $r$  ) de 0,98 (figure 17B, médaillon). Confirmant ainsi la grande similitude entre le récepteur  $A_{2B}$  de cobaye et celui de l'Homme.

#### **4.5. AUTRES RÉCEPTEURS DE L'ADÉNOSINE SUR LES CELLULES ÉPITHÉLIALES DE LA TRACHÉE DE COBAYE EN CULTURE.**

Tel que mentionné précédemment, les récepteurs de l'adénosine sont généralement caractérisés par l'entremise de leur voie de signalisation. Le récepteur  $A_1$  est généralement couplé à l'inhibition de l'adénylyl cyclase et peut être identifié par l'utilisation d'agonistes sélectifs comme le CPA sur l'inhibition de l'activité de l'adénylyl cyclase induite par la forskolin (Alexander *et al.*, 1994a). Nos résultats démontrent que le CPA est incapable d'inhiber la génération d'AMP cyclique induite par la forskolin à des concentrations maximales d'agoniste, ce qui suggère que l'épithélium de la trachée de cobaye n'exprime pas ce type de récepteur ou ne l'exprime que très peu. De plus, en présence d'adénosine déaminase (ce qui permet d'enlever toute trace d'adénosine), l'agoniste sélectif  $A_{2A}$ , le CGS21680 semble totalement inefficace à stimuler l'adénylyl cyclase. Ces observations sont contraires à celles qui se rapportent aux récepteurs  $A_1$  et  $A_{2A}$  (Feoktistov & Biaggioni, 1993; Alexander *et al.*, 1994a).

La présence de récepteurs  $A_2$  au niveau de l'épithélium a été rapportée dans plusieurs études, mais la distinction entre les deux sous-types n'a pas été effectuée (Ukena *et al.*, 1985; Pratt *et al.*, 1986; Lazarowski *et al.*, 1992; Joad & Kott, 1993). Par contre, la présence de récepteurs  $A_1$  demeure encore incertaine. Plusieurs études suggèrent que ce type de récepteur n'est pas présent (Pratt *et al.*, 1986; Lazarowski *et al.*, 1992; Joad & Kott, 1993). Mais, par l'utilisation de la biologie moléculaire et de la biochimie, la

présence de ce type de récepteur a été rapportée au niveau de l'épithélium de sujets normaux et de patients souffrant de la fibrose kystique (McCoy *et al.*, 1995).

#### **4.6. IMPLICATION DE L'AMP CYCLIQUE DANS LA RÉGULATION DE LA PRODUCTION/SÉCRÉTION d'ET PAR LES CELLULES ÉPITHÉLIALES DE LA TRACHÉE DE COBAYE.**

L'implication de l'AMP cyclique dans la modulation de la production de l'ET-1 a déjà été rapportée au niveau des cellules mésangiales de rat où la forskolin et l'isoprotérénol (un agoniste non sélectif  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -adrénergique) diminuent la production/sécrétion de l'ET-1 (Sakamoto *et al.*, 1992). Des résultats semblables ont déjà été obtenus dans notre laboratoire où l'incubation de différents agonistes  $\beta_2$ -adrénergiques (Salmétérol, Salbutamol et l'isoprotérénol) et la présence de forskolin et de 8-Br-cyclic AMP stimule la formation d'AMP cyclique et l'inhibition de la production de l'ET-1 (Yang *et al.*, 1998). Une autre étude met en relation l'AMP cyclique intracellulaire et la production d'ET-1 par les cellules endothéliales de la microcirculation du cerveau où le 8-Br-cAMP (un analogue de l'AMP cyclique perméable aux membranes cellulaires) diminue la production/sécrétion de l'ET-1 et ce à des concentrations de l'ordre du micromolaire (Durieu-Trautman *et al.*, 1993). Par contre, l'effet inhibiteur de la  $PGE_2$  sur la production /sécrétion de l'ET-1 par les cellules endothéliales n'a pas permis de mettre en évidence l'implication de l'AMP cyclique puisque le Rp-cAMP-S, un inhibiteur compétitif de la sous-unité régulatrice de la PKA, n'a pas renversé l'effet inhibiteur de la

PGE<sub>2</sub> (Prins *et al.*, 1994). Les auteurs de cette étude ont plutôt proposé que l'effet inhibiteur de la PGE<sub>2</sub> sur la production de l'ET-1 était généré par la production de GMP cyclique et l'activation de la PKG. Néanmoins, ces études et les résultats présentés ici suggèrent que l'activation d'un récepteur couplé à une protéine de type G<sub>s</sub> permet de diminuer la production/sécrétion de l'ET-1. Quant à l'adénosine, une autre étude a rapporté que ce médiateur stimulait la production/sécrétion de l'ET-1 via l'activation du récepteur A<sub>1</sub> à l'adénosine (récepteur couplé à une protéine G<sub>i</sub>) au niveau des cellules FRLP-5 (Vanio *et al.*, 1996). Cette observation est en accord avec les résultats obtenus dans le cadre de nos travaux puisque l'activation de l'adénylyl cyclase semble inhiber cette production/sécrétion. À l'opposé, l'inhibition de l'adénylyl cyclase devrait, théoriquement, résulter en une augmentation de cette production/sécrétion d'ET-1. Jusqu'à présent, cette hypothèse n'a pu être confirmée dans une étude où des analogues de l'AMP cyclique et des agonistes activant des récepteurs couplés à des protéines régulatrices de type G<sub>s</sub>, stimulaient la production/sécrétion de l'ET-1 au niveau des cellules tumorales mammaires (Patel *et al.*, 1997). Néanmoins, la corrélation entre la formation d'AMP cyclique et l'inhibition de la production d'ET-1 ne démontre pas le mécanisme d'action intracellulaire de ces autacoïdes. Afin de déterminer ce mécanisme d'action, plusieurs études devraient être faites. D'abord une approche pharmacologique, soit l'utilisation de différents inhibiteurs de l'adénylyl cyclase ou de la guanylyl cyclase, des inhibiteurs de la PKA et aussi des autres protéines kinases comme la PKC, la PKG, Cam kinase et plusieurs autres pourraient être utilisés sur l'inhibition de la synthèse d'irET par l'adénosine et la PGE<sub>2</sub>. Par contre, ces composés sont faiblement perméable au membranes les rendants difficiles

d'utilisation. Des méthodes biochimiques comme l'expression de dominants négatifs de la PKA, de l'adénylyl cyclase et des autres enzymes susceptibles d'être impliquées pourrait donc être envisagées. L'étude du promoteur du gène de l'ET-1, l'expression de ce dernier, la stabilité de son messenger sont aussi d'autres voies intéressantes afin de comprendre le mécanisme d'action de la  $PGE_2$  et de l'adénosine sur la production de ce peptide.

La voie de signalisation intracellulaire impliquée dans la régulation de l'ET-1 au niveau des cellules épithéliales de la trachée de cobaye demeure toujours inconnue. De plus, le niveau auquel se situe cette régulation, soit transcriptionnelle, traductionnelle ou post-traductionnelle est lui aussi inconnu. Les travaux de Prins et al., (1994) ont suggéré que chez les cellules endothéliales d'aorte bovine, la régulation de l'ET-1 serait faite au niveau transcriptionnel via l'activation de la PKG. Un autre groupe de recherche, celui de Graf et al., (1994), a démontré que l'activation de récepteurs couplés aux protéines régulatrices  $G_s$  et la présence d'analogues de l'AMP cyclique augmentaient l'activité des endopeptidases neutres (enzymes responsables de la dégradation de l'ET-1 (Koremu *et al.*, 1997)) au niveau des cellules endothéliales, suggérant ainsi une autre alternative dans le mécanisme de régulation de la production de ce peptide.

#### **4.7. EFFET DE L'ADÉNOSINE SUR LA PRODUCTION/SÉCRÉTION STIMULÉE D'ET-1 PAR LES CELLULES ÉPITHÉLIALES DE LA TRACHÉE DE COBAYE.**

Dans des conditions inflammatoires, les cellules épithéliales de la trachée et des voies respiratoires produisent de grandes quantités d'ET-1 (Yang *et al.*, 1997; Pelletier *et al.*, 1998). Dans les travaux présentés ici, l'effet de l'adénosine sur la production d'irET par l'épithélium a été évalué. Nos résultats ont démontré que l'adénosine, à des concentrations reconnues afin d'activer le récepteur  $A_{2B}$ , inhibe la production/sécrétion stimulée d'irET. Ces résultats suggèrent que l'adénosine agit en tant qu'inhibiteur de la synthèse de l'ET-1 dans des conditions normales et pathophysiologiques et ce, probablement via l'activation du récepteur  $A_{2B}$ .

#### **4.8. IMPLICATION DE L'ADÉNOSINE ET DE LA $PGE_2$ SUR LES PLANS PHYSIOLOGIQUE ET PATHOPHYSIOLOGIQUE.**

Les récepteurs à l'adénosine au niveau des cellules épithéliales des voies aériennes semblent être impliqués dans divers processus physiologiques et pathophysiologiques. En effet, les récepteurs  $A_2$  et  $A_1$  ont été localisés au niveau de l'épithélium des voies respiratoires humaines (Lazarowski *et al.*, 1992; Joad & Kott, 1993) de chien (Pratt *et al.*, 1986) et de cobaye (Ukena *et al.*, 1985) et semblent impliqués dans la régulation de la conductance de l'ion chlorure (Pratt *et al.*, 1986; Lazarowski *et al.*, 1992; McCoy *et al.*,

1995). La présence du récepteur  $A_1$  au niveau de l'épithélium des voies aériennes a soulevé longtemps la controverse. Ce récepteur a été identifié par RT-PCR et immunobuvardage sur des cellules normales et sur celles de patients souffrant de la fibrose kystique (McCoy *et al.*, 1995). Par contre une caractérisation pharmacologique complète de ce récepteur n'a pas été effectuée dans l'étude du groupe de McCoy *et al.*, (1995) et plusieurs autres études concluent en sens contraire (Pratt *et al.*, 1986; Lazarowski *et al.*, 1992; Joad & Kott, 1993). Néanmoins, l'adénosine semble impliquée dans la fibrose kystique puisqu'elle possède la capacité de modifier le transport des ions chlorure, cette modification étant l'une des caractéristiques de cette maladie (Frizzel *et al.*, 1986; Boucher *et al.*, 1988; Riordan *et al.*, 1989).

Puisque la  $PGE_2$ , comme l'adénosine influence la génération d'AMP cyclique au niveau des cellules épithéliales de la trachée, il serait intéressant de déterminer son implication au niveau du transport des ions chlorures par l'épithélium de patients souffrant de fibrose kystique comparativement à celui de patients ne souffrant pas de cette maladie. En fait, une étude a rapporté l'effet de prostaglandine sur la conductance de l'ion chlorure au niveau de l'épithélium des voies respiratoires canines (Al-Bazzaz *et al.*, 1981). Par contre, l'implication de la  $PGE_2$  dans un modèle pathophysiologique n'a pas, à notre connaissance, été rapportée. De plus la caractérisation du type de récepteurs des prostaglandines présent sur cet épithélium n'a pas été entreprise jusqu'à ce jour.

L'endothéline-1 est un autre médiateur qui influence le transport de l'ion chlorure au niveau des cellules épithéliales de la trachée (Plews *et al.*, 1991). Ainsi la modulation de la production de ce peptide au niveau de l'épithélium pourrait être impliquée dans la



modulation de transport des ions chlorures. Ce peptide est aussi impliqué dans d'autres maladies (Revue par Battisini *et al.*, 1994) telles l'hypertension pulmonaire (Cernacek & Stewart, 1989; Horgan *et al.*, 1991) et l'asthme (Uchida *et al.*, 1988; Boichot *et al.*, 1991). Ainsi la régulation de ce peptide par l'adénosine, la prostaglandine  $E_2$  ou par d'autres agents stimulant la génération d'AMP cyclique, semble être une alternative intéressante en vue d'atténuer ses effets.

#### **4.9. COMPARAISONS ENTRE LES EFFETS DE L'ADÉNOSINE ET DE LA $PGE_2$ SUR LA GÉNÉRATION D'AMP CYCLIQUE.**

Un point intéressant de cette étude est le fait que l'adénosine, en comparaison avec la  $PGE_2$  induit moins fortement la génération d'AMP cyclique par les cellules épithéliales de la trachée de cobaye. Plusieurs raisons peuvent expliquer ce fait. D'abord les conditions expérimentales font en sorte que le niveau basale de conversion d' $[^3H]$ -ATP en  $[^3H]$ -AMP cyclique est supérieur dans les essais utilisant les plaques de 24 puits comparativement aux essais utilisant les plaques de 6 puits. Ceci est dû à la différence d'incorporation d' $[^3H]$ -adénine. Néanmoins, si l'on observe les effets de la  $PGE_2$  et de l'adénosine de façon à pouvoir les comparer, soit en nombre de fois que ces agonistes augmente le niveau basale de conversion de l' $[^3H]$ -ATP en  $[^3H]$ -AMP cyclique, on remarque que la  $PGE_2$  induit une production d'AMP cyclique équivalente à  $25.1 \pm 1.5$  fois le niveau basale alors que l'adénosine ne l'augmente que de  $3.2 \pm 0.6$  fois. Ceci peut être expliqué de deux façons. D'abord, le nombre de récepteurs  $EP_4$  exprimés à la surface

des cellules épithéliales peut être supérieur à celui des récepteurs  $A_{2B}$ , ce qui permet à la  $PGE_2$  de générer beaucoup plus d'AMP cyclique que l'adénosine. Une deuxième raison pouvant expliquer ce phénomène est l'efficacité du couplage de ces deux populations de récepteurs aux seconds messagers, soit les différentes protéines G et les différents sous-types adénylyl cyclases puisqu'il est possible que ces dernières possèdent des affinités différentes entre elles et envers les différents récepteurs. Par contre, afin de comparer l'activité de ces deux médiateurs, soit la  $PGE_2$  et l'adénosine, des études dans des conditions identiques (même niveau d'incorporation d' $[^3H]$ -adénine) et l'utilisation du même nombre de cellules aurait été préférable.

Une autre observation intéressante est celle où la  $PGE_2$  et l'adénosine possèdent un  $EC_{50}$ , observé sur la génération d'AMP cyclique, plus élevé que les  $IC_{50}$  observés sur l'inhibition de la production d'irET. Il est à noter que l' $EC_{50}$  de la  $PGE_2$  sur la génération d'AMP cyclique est 10 fois plus élevé que l' $IC_{50}$  déterminé pour ses effets sur l'inhibition de la production d'irET par les cellules épithéliales de la trachée de cobaye. Ceci est probablement dû au fait qu'un niveau d'AMP cyclique très élevé n'est pas nécessaire ou même requis afin de produire un effet maximal sur la production d'irET. La cascade d'amplification du signal intracellulaire semble suffisant. Des résultats semblables ont été observés pour l'adénosine où la différence entre l' $EC_{50}$  et l' $IC_{50}$  est d'un facteur 5.

## CONCLUSION

En résumé, les résultats présentés dans ce mémoire démontrent que:

1. Les cellules épithéliales de la trachée de cobaye produisent et sécrètent de façon constitutive d'importantes quantités d'ET-1.
2. La  $PGE_2$  et l'adénosine diminuent cette production/sécrétion d'ET-1 par les cellules épithéliales. Du même coup, l'adénosine et la  $PGE_2$  augmentent la génération d'AMP cyclique de ces cellules. De plus, une étroite corrélation existe entre les deux phénomènes.
3. Les récepteurs à l'adénosine et aux prostaglandines responsables de la génération d'AMP cyclique au niveau de l'épithélium sont du type  $A_{2B}$  et  $EP_4$ , respectivement.
4. L'utilisation d'antagonistes puissants sur ces types de récepteurs a permis de contrer les actions inhibitrices de l'adénosine et de la  $PGE_2$  sur la production/sécrétion d'ET-1.
5. Des conditions inflammatoires augmentent la production/sécrétion d'ET-1 et l'adénosine diminue cette augmentation.

Finalemant, ces résultats suggèrent que l'adénosine et la  $\text{PGE}_2$ , via les récepteurs  $\text{A}_{2\text{B}}$  et  $\text{EP}_4$ , respectivement, possèdent des fonctions protectrices au niveau des voies aériennes puisqu'elles inhibent la production d'un agent bronchoconstricteur impliqué dans la pathophysiologie de l'asthme.

## **REMERCIEMENTS**

J'aimerais d'abord remercier le Dr Pierre Sirois pour la chance qu'il m'a donnée en m'acceptant en tant qu'étudiant d'été et à la maîtrise. Je le remercie aussi pour son expertise scientifique, sa confiance, son esprit critique et ses judicieux conseils qui ont permis de réaliser ce projet.

Je remercie également:

Le Dr Gaétan Guillemette pour ses judicieux conseils, pour son esprit critique, pour l'accès et l'expertise de son laboratoire et finalement pour la correction de ce mémoire.

Le Dr André De Léan pour la correction de ce mémoire.

Le Dr Bruno Battistini pour sa confiance, son esprit fonceur et son support technique et scientifique.

Le Dr Fernand Gobeil Jr, la Dr Sylvie G. Bernier et Mme Solange Cloutier pour leur support technique, leur précieux conseils tant sur le plan scientifique qu'humain.

Mes collègues de laboratoire qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce projet et pour leur amitié tels que Mme Annie Villeneuve, M. Jean-François Blain, Mme Andrée Lepage et finalement M. Pierre Farmer.

Les professeurs du département de pharmacologie de l'université de Sherbrooke qui ont participé à ma formation.

Les étudiantes et étudiants de ce même département pour leur amitié.

Et finalement, je remercie tout particulièrement mes parents et ma copine Charlène pour leur support moral et financier et pour leur encouragements.

## RÉFÉRENCES

- AL-BAZZAZ F., KELSEY F.J. & KAAGE W.D. (1985) Substance P stimulation of chloride secretion by canine tracheal mucosa. *Am.Rev.Resp.Dis.* **131**, 186-189.
- AL-BAZZAZ F., YADAVA V.P. & WESTENFELDER C. (1981) Modification of Na and Cl transport in canine tracheal mucosa by prostaglandins. *Am.J.Physiol* **240**, F101-F105.
- ALEXANDER S.P.H., COOPER J., SHINE J. & HILL S.J. (1996) Characterization of the human brain putative A<sub>2B</sub> adenosine receptor expressed in chinese hamster ovary (CHO.A<sub>2B4</sub>) cells. *Br.J.Pharmacol.* **119**, 1286-1290.
- ALEXANDER S.P.H., CURTIS A.R., KENDALL D.A. & HILL S.J. (1994a) A<sub>1</sub> adenosine receptor inhibition of cyclic AMP formation and radioligand binding in the guinea-pig cerebral cortex. *Br.J.Pharmacol.* **113**, 1501-1507.
- ALEXANDER S.P.H., LOSINSKI A., KENDALL D.A. & HILL S.J. (1994b) A comparison of A<sub>2</sub> adenosine receptor-induced cyclic AMP generation in cerebral cortex and relaxation of pre-contracted aorta. *Br.J.Pharmacol.* **111**, 185-190.
- ALI S., MUSTAFA S.J. & METZGER W.J. (1997) Adenosine-induced bronchoconstriction and contraction of airway smooth muscle from allergic rabbits with late-phase airway obstruction: evidence for an inducible adenosine A<sub>1</sub> receptor. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **268**, 1328-1334.

- BIRNBAUMER L. (1992) Receptor-to-effector signalling through G proteins: roles for b/g dimers as well as a subunits. *Cell* **71**, 1069-1072.
- BLACK P.N., GHATEI M.A., TAKAHASHI K., BRETHERTON-WATT D., KRAUSZ T., DOLLERY C.T. & BLOOM SR (1989) Formation of endothelin by cultured airway epithelial cells. *FEBS Lett.* **255**, 129-132.
- BOICHOT E., CARRE C., LAGENTE V., PONS F. & MENCIA-HUERTA J.M. (1991) Endothelin-1 and bronchial hyperresponsiveness in the guinea pig. *J.Cardiovasc.Pharm.* **17**, S329-S331.
- BOUCHER R.C., COTTON C.U., GATZY J.T. & KNWLES M.R. (1988) Evidence for reduced  $\text{Cl}^-$  and increased  $\text{Na}^+$  permeability in cystic fibrosis human primary cell cultures. *J.Physiol.-London* **405**, 77-103.
- BRACKETT I.E. & DALY J.W. (1994) Functional characterization of the  $\text{A}_{2\text{B}}$  adenosine receptor in NIH 3T3 fibroblasts. *Biochem.Pharmacol.* **47**, 801-814.
- BRASS L.F., SHALLER C.C. & BELMONTE E. (1987) Inositol 1, 4, 5-triphosphate-induced granule secretion in platelets. Evidence that the activation of phospholipase C mediated by platelets thromboxane receptors involves a guanine nucleotide binding protein-dependent mechanism distinct from that of thrombin. *Journal of Clinical Investigation* **79**, 1269-1275.
- BREYER R.M., EMESON R.B., TARNG J.-L., BREYER M.D., DAVIS L.S., ABROMSON R.M. & FERRENBACH S.M. (1994) Alternative splicing



generates multiple isoforms of a rabbit prostaglandin E<sub>3</sub> receptor. *J.Biol.Chem.* **269**, 6163-6169.

BRUNS R.F., FERGUS J.H., BADGER E.W., BRISTOL J.A., SANTAY L.A., HARTMAN J.D., HAYS S.J. & HUANG C.C. (1987) Binding of the A<sub>1</sub>-selective adenosine antagonist 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine to rat membranes. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **335**, 59-63.

BRUNS R.F., LU G.H. & PUGSLEY T.A. (1986) Characterization of the A<sub>2</sub> adenosine receptor labeled by [<sup>3</sup>H]NECA in rat striatal membranes. *Mol.Pharmacol.* **29**, 331-346.

CALDERON E., GOMEZ-SANCHEZ C.E., COZZA E.N., ZHOU M., GOFFEY R.G., LOCKLEY R.F., PROCKOP L.D. & SZENTIVANY A. (1994) Modulation of endothelin-1 production by a pulmonary epithelial cell line. *Biochem.Pharmacol.* **48**, 2065-2071.

CASADÓ m.V., CASILLAS T., MALLOL J., CANELA E.I., LLUIS C. & FRANCO R. (1992) The adenosine receptors present on the plasma membrane of chromaffin cells are of the A<sub>2B</sub> subtype. *J.Neurochem.* **59**, 425-431.

CERNACEK P. & STEWART D.J. (1989) Immunoreactive endothelin in human plasma: marked elevations in patients in cardiogenic shock. *Biochem.Bioph.Res.Co.* **161**, 562-567.

- CHURCH M.K., HOLGATE S.T. & HUGHES P.J. (1983) Adenosine inhibits and potentiates IgE-dependent histamine release from human basophils from an A<sub>2</sub>-receptor mediated mechanism. *Br.J.Pharmacol.* **80**, 726.
- COLEMAN R.A., GRIX S.P., HEAD S.A., LOUTTIT J.B., MALLET A. & SHEKDRICK R.L.G. (1994) A novel inhibitory prostanoid receptor piglet saphenous vein. *Prostaglandins* **47**, 151-168.
- COLEMAN R.A. & KENNEDY I. (1985) Characterisation of the prostanoid receptors mediating contraction of isolated guinea pig trachea. *Prostaglandins* **29**, 363-375.
- COLEMAN R.A., KENNEDY I., HUMPHREY P.P.A., BUNCE K. & LUMLEY P. (1990) Prostanoids and their receptors. *Comprehensive Medicinal Chemistry* **3**, 643-714.
- COLEMAN R.A., KENNEDY I. & SHELDRIK R.L.G. (1987) New evidence with selective agonists and antagonists for the subclassaification of PGE<sub>2</sub>-sensitive (EP) receptors. *Advences in Prostaglandin, Thromboxane and Leukotriene Research* **17**, 467-470.
- COLEMAN R.A., WILLIAM L.SMITH & NARUMIYA S. (1994) Classification of prostanoids receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol.Rev.* **46**, 205-229.

- COOPER J., HILL S.J. & ALEXANDER S.P.H. (1997) An endogenous A<sub>2B</sub> adenosine receptor coupled to cyclic AMP generation in human embryonic kidney (HEK 293) cells. *Br.J.Pharmacol.* **122**, 546-550.
- CREESE B.R. & DENBOROUGH M.A. (1981) The effects of prostaglandin E<sub>2</sub> on contractility and cyclic AMP levels of guinea-pig tracheal smooth muscle. *Clin.Exp.Pharmacol.P.* **8**, 616-617.
- DALY J.W., BUTTS-LAMB P. & PADGETT W. (1983) Subclasses of adenosine receptors in the central nervous system: interaction with caffeine and related methylxanthines. *Cell.Mol.Neurobiol.* **3**, 69-80.
- DE BRUM-FERNANDES A.J., MORISSET M., BKAILY G. & PATRY C. (1996) Characterization of the PGE<sub>2</sub> receptor subtype in bovine chondrocytes in culture. *Br.J.Pharmacol.* **118**, 1597-1604.
- DE VRIES G.W., GUARINO P., MCLAUGHLIN A., CHEN J., ANDREWS S. & WOODWARD D.F. (1995) An EP receptor with a novel pharmacological profile in the T-cell line Jurkatt. *Br.J.Pharmacol.* **115**, 1231-1234.
- DELAHUNTY T.M. & LINDEN J. (1988) Adenosine inhibits TRH-stimulated phosphoinositide hydrolysis and reduces inositol phosphate accumulation in GH3 cells. *FASEB Journal* **2**, A1132.

- DENAULT J.B., CLAING A., D'ORLÉANS-JUSTE P., SAWARA T., KIDO T., MASAKI T., LEDUC, R. (1998) Processing of proendothelin-1 by human furine convertase. *FEBS Lett.* **362** 276-280.
- DUBEY R.K., GILLESPIE D.G., OSAKA K., SUZUKI F. & JACKSON E.K. (1996) Adenosine inhibits growth of rat aortic smooth muscle cells. Possible role of A<sub>2B</sub> receptor. *Hypertension* **27**, 786-793.
- DURIEU-TRAUTMAN O., FÉDÉRICI C., CRÉMINON C., FOIGNANT-CHAUVEROT N., ROUX F., CLAIRE M., STROSBERG A.D. & COURAUD P.O. (1993) Nitric oxide and endothelin secretion by brain microvessel endothelial cells: regulation by cyclic nucleotides. *J.Cell.Physiol.* **155**, 104-111.
- ELFMAN L., LINDGREN E., WALUM E. & FREDHOLM B.B. (1984) Adenosine analogues stimulate cyclic AMP-accumulation in cultured neuroblastoma and glioma cells. *Acta Pharmacol.Toxicol.* **55**, 297-302.
- EVANS M.J. & PLOPPER C.G. (1988) The role of basal cells in adhesion of columnar epithelium to airway basement membrane. *Am.Rev.Resp.Dis.* **138**, 481-483.
- FEOKTISTOV I. & BIAGGIONI I. (1993) Characterization of adenosine receptors in human erythroleukemia cells and platelets: further evidence for heterogeneity of adenosine A<sub>2</sub> receptor subtypes. *Mol.Pharmacol.* **43**, 909-914.
- FEOKTISTOV I. & BIAGGIONI I. (1995) Adenosine A<sub>2B</sub> receptors evoke interleukin-8 secretion in human mast cells. *Journal of Clinical Investigation* **96**, 1979-1986.

FEOKTISTOV I. & BIAGGIONI I. (1997) Adenosine A<sub>2B</sub> receptors. *Pharmacol.Rev.* **49**, 381-402.

FEOKTISTOV I., MURRAY J.J. & BIAGGIONI I. (1994) Positive modulation of intracellular Ca<sup>2+</sup> levels by adenosine A<sub>2B</sub> receptors, prostacyclin, and prostaglandin E<sub>1</sub> via cholera toxin-sensitive mechanism in human erythroleukemia cells. *Mol.Pharmacol.* **45**, 1160-1167.

FEOKTISTOV I., POLOSA R., HOLGATE S.T. & BIAGGIONI I. (1998) Adenosine A<sub>2B</sub> receptors: a novel therapeutic target in asthma? *Trends Pharmacol.Sci.* **19**, 148-153.

FIEBICH B.L., BIBER K., GYUFKO K., BERGER M., BAUER J. & VAN CALKER D. (1996) Adenosine A<sub>2B</sub> receptors mediate an increase in Interleukin (IL)-6 mRNA and IL-6 protein synthesis in human astroglioma cells. *J.Neurochem.* **66**, 1426-1431.

FREDHOLM B.B., ABBRACCHIO M.P., BURNSTOCK G., DALY J.W., HARDEN T.K., JACOBSON K.A., LEFF P. & WILLIAMS M. (1994) Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol.Rev.* **46**, 143-156.

FREISSMUTH M., SCHÜTZ W. & LINDER M.E. (1991) Interactions of the bovine brain A<sub>1</sub>-adenosine receptor with recombinant G protein  $\alpha$  subunits. Selectivity for  $G_{i\alpha-3}$ . *J.Biol.Chem.* **266**, 17778-17783.

- FRIZZEL R.A., RECHKEMMER G. & SHOEMAKER R.L. (1986) Altered regulation of airway epithelial cell chloride secretion in the mammalian ileum. *Science* **233**, 558-560.
- GARDINER P.J. (1986) Characterisation of prostanoid relaxant/inhibitory receptors (121) using a highly selective agonist, TR4979. *Br.J.Pharmacol.* **87**, 45-56.
- GERWINS P. & FREDHOLM B.B. (1992) ATP and its metabolite adenosine act synergistically to mobilize intracellular calcium via the formation of inositol 1, 4, 5,-triphosphate in a smooth muscle cell line. *J.Biol.Chem.* **267**, 16081-16087.
- GERWINS P. & FREDHOLM B.B. (1994) Adenosine A<sub>1</sub> agonists stimulate protein kinase C in a smooth muscle cell line. *J.Biol.Chem.*
- GLASSBERG M.K., ERGUL A., WANNER A. & PUETT D. (1994) Endothelin-1 promotes mitogenesis in airway smooth muscle cells. *Am.J.Resp. Crit.Care* **10**, 316-321.
- GORDON J.L. (1986) ATP: effects, sources and fate. *Biochem.J.* **223**, 309-319.
- GUSOVSKY F. (1991) Prostaglandin receptors in NIH3T3 cells: coupling of one receptor to adenylate cyclase and of a second receptor to phospholipase C. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **40**, 633-638.(Abstract)

- HALLER H., SCHABERG T., LINDSCHAU C., LODE H. & DISTLER A. (1991) Endothelin increases  $[Ca^{2+}]_i$ , protein phosphorylation, and  $O_2^-$  production in human alveolar macrophages. *Am.J.Physiol* **261**, L478-L484
- HAMBERG M. & SAMUELSSON B. (1967) *J.Biol.Chem.* **242**, 5336-5343.
- HARDCASTLE J., HARDCASTLE P. & REDFERN J. (1982) Morphine has no direct effect on PGE<sub>2</sub>-stimulated cyclic AMP production by rat isolated enterocytes. *J.Pharm.Pharmacol.* **34**, 68.
- HASHIMOTO H., NEGISHI M. & ICHIKAWA A. (1990) Identification of a prostacyclin receptor coupled to the adenylate cyclase system via a stimulatory GTP-binding protein in mouse mastocytoma P-815 cells. *Prostaglandins* **40**, 491-505.
- HASTIE A.T., LEOGERING D.A., GLEICH G.J. & KUEPPERS F. (1987) The effect of purified human eosinophil major basic protein on mammalian ciliary motility. *Am.Rev.Resp.Dis.* **135**, 848-853.
- HERNANDEZ F., KENDALL D.A. & ALEXANDER S.P.H. (1993) Adenosine receptor-induced second messenger production in adult guinea-pig cerebellum. *Br.J.Pharmacol.* **110**, 1085-1090.
- HERSCHMAN H.R. (1994) *Cancer Metastasis Research* **13**, 241-256.

- HIDE I., PADGETT W.L., JACOBSON K.A. & DALY J.W. (1992) A<sub>2</sub> adenosine receptors from rat striatal and pheochromocytoma PC12 cells: characterization with radioligand binding and by activation of adenylate cyclase. *Mol.Pharmacol.* **41**, 352-359.
- HLA T. & NEILSON K. (1992) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **89**, 7384-7388.
- HONDA A., SUGIMOTO Y., NAMBA T., WATABE A., IRIE A., NEGISHI M., NARUMIYA S. & ISHIKAWA A. (1993) Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin E receptor EP<sub>2</sub> subtype. *J.Biol.Chem.* **268**, 7759-7762.
- HORGAN M.J., PINHEIRO J.M.B. & MALIK A.B. (1991) Mechanism of endothelin-1-induced pulmonary vasoconstriction. *Circ.Res.* **69**, 157-164.
- HUGHES P.J., HOLGATE S.T. & CHURCH M.K. (1984) Adenosine inhibits and potentiates IgE-dependent histamine release from human basophils from an A<sub>2</sub>-purinoceptor mediated mechanism. *Biochem.Pharmacol.* **33**, 3847-3852.
- INUI T., JAMES A.F., FUJITANI Y., TAKIMOTO M., OKADA T., YAMAMURA T. & URADE Y. (1994) ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptors on single smooth muscle cells cooperate in mediating guinea pig tracheal contraction. *Am.J.Physiol* **266**, L113-L124.
- IRIE A., SUGIMOTO Y., NAMBA T., HARAZONO A., HONDA A., WATABE A., NEGISHI M., NARUMIYA S. & ICHIKAWA A. (1993) Third isoform of the prostaglandin-E-receptor EP<sub>3</sub> subtype with different C-terminal tail coupling to



both stimulation and inhibition of adenylate cyclase. *Eur.J.Pharmacol.* **217**, 313-318.

ITO S., HASHIMOTO H., NEGISHI M., SUZUKI M., KOYANO H., NOYORI R. & ICHIKAWA A. (1992) Identification of the prostacyclin receptor by use of [15-<sup>3</sup>H]19-(3-azidophenyl)-20-norisocarbaprostacyclin, an irreversible specific photoaffinity probe. *J.Biol.Chem.* **267**, 20326-20330.

ITO S., OKUDA E., SUGAMA K., NEGISHI M. & HAYAISHI O. (1990) Evaluation of ZK110841 and AH6809, an agonist and an antagonist of prostaglandin DP receptor on human platelets, with pGD<sub>2</sub>-responsive cell line from bovine embryonic trachea. *Br.J.Pharmacol.* **99**, 13-14.

JACOBY D.B., UEKI I.F., WIDDICOMBE J.H., LOEGERING D.A. & GLEICH G.J. (1988) Effect of human eosinophil major basic protein on ion transport in dog epithelium. *Am.Rev.Resp.Dis.* **137**, 13-16.

JARVIS M.F., SCHULTZ R., HUTCHINSON A.J., DO U.H., SILLIS M.A. & WILLIAMS M. (1989) [<sup>3</sup>H]CGS 21680, a selective A<sub>2</sub> adenosine receptor agonist directly labels A<sub>2</sub> receptors in rat brain. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **251**, 888-893.

JOAD J.P. & KOTT K.S. (1993) Effect of adenosine receptor ligands on cAMP content in human airways and peripheral lung. *Am.J.Resp.Cell Mol.* **9**, 134-140.

- JON J., MIAO G.F. & ASHBY B. (1997) Constitutive activity of human prostaglandin E receptor EP<sub>3</sub> isoforms. *Br.J.Pharmacol.* **121**, 317-323.
- JUMBLATT M.M. & PETERSON C.A. (1991) Prostaglandin E<sub>2</sub> effects on corneal endothelial cyclic adenosine monophosphate synthesis and cell shape are mediated by a receptor of the EP<sub>2</sub> subtype. *Invest.Opth.Vis.Sci.* **32**, 360-365.
- KEERY R.J. & LUMLEY P. (1988) AH 6809, a prostaglandin DP receptor blocking drug on human platelets. *Br.J.Pharmacol.* **94**, 745-754.
- KENAKIN T.P. (1987) Drug antagonism. *Pharmacological Analysis of drug-receptor interaction.* 205-244.
- KENDALL D.A. & HILL S.J. (1988) Adenosine inhibition of histamine-stimulated inositol phospholipid hydrolysis in mouse cerebral cortex. *J.Neurochem.* **5**, 497-502.(Abstract)
- KIM K.C., NASSIRI J. & BRODY J.S. (1989) Mechanism of airway goblet cell mucin release: Studies with cultured tracheal surface epithelial cells. *Am.J.Resp.Cell Mol.* **1**, 137-143.
- KIRIYAMA M., USHIKUBI F., KOBAYASHI T., HIRATA M., SUGIMOTO Y. & NARUMIYA S. (1997) Ligand binding specificities of the eight types and subtypes of the mouse prostanoid receptors expressed in chinese hamster ovary cells. *Br.J.Pharmacol.* **121**, 1673-1678.

- KNEZEVIC I., BORG C. & LE BRETON G.C. (1993) Identification of Gq as one of the G-protein which copurify with human platelet thromboxane A<sub>2</sub>/prostaglandin H<sub>2</sub> receptors. *J.Biol.Chem.* **268**, 26011-26017.
- KOBAYASHI K., TAMAOKI J., SAKAI N., KANEMURA T., HARI S. & TAKIZAWA T. (1990) Angiotensin II stimulates airway ciliary motility in rabbit cultured tracheal epithelium. *Acta Physiol.Scand.* **138**, 497-502.
- KONDO M., TAMAOKI J. & TAKIZAWA T. (1990) Neutral endopeptidase inhibitor potentiates the tachykinin-induced increase in ciliary beat frequency in rabbit trachea. *Am.Rev.Resp.Dis.* **142**, 403-406.
- KOREMU K.M., BARNES P.J. & GIEMBYCZ M.A. (1997) Characterization of the prostanoid receptor(s) on human blood monocytes at which prostaglandin E<sub>2</sub> inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- $\alpha$  generation. *Br.J.Pharmacol.* **122**, 149-157.
- KUJUBU D.A., FLETCHER B.S., VARNUM B.C., LIM R.W. & HERSCHMAN H.R. (1991) *J.Biol.Chem.* **266**, 12866-12872.
- KUO H.-P., ROHDE J.A.L., TOKUYAMA, BARNES P.J. & ROGERS D. (1990) Capsaicin and sensory neuropeptide stimulation of goblet cell secretion in guinea-pig trachea. *J.Physiol.-London* **431**, 629-641.

- LAPORTE J., D'ORLÉANS-JUSTE P. & SIROIS P. (1996) Guinea-pig Clara cells secrete endothelin-1 through a phosphoramidon-sensitive pathway. *Am.J.Resp.Cell Mol.* **14**, 356-362.
- LAZAROWSKI E.R., MASON S.J., CLARKE L., HARDEN T.K. & BOUCHER R.C. (1992) Adenosine receptors on human airway epithelia and their relationship to chloride secretion. *Br.J.Pharmacol.* **106**, 774-782.
- LEIKAUF G.D., UEKI I.F., WIDDICOMBE J.H. & NADEL J.A. (1986) Alterations of chloride secretion across canine tracheal epithelium by lipoxygenase products of arachidonic acid. *Am.J.Physiol* **250**, F47-F53.
- LELLOUCH-TUBIANA A., LEFORT J.O., SIMON M.-T., PFISTER A. & VARGAFTIG B.B. (1988) Eosinophil recruitment into guinea-pig lungs after PAFacether and allergen administration. *Am.Rev.Resp.Dis.* **137**, 948-954.
- LIBERT F., SCHIFFMANN S.N., LEFORT A., PARMENTIER M., GERARD C., DUMONT J.E. & VANDERHAEGHEN J.J. (1991) The orphan receptors cDNA RDC7 encodes an A<sub>1</sub> adenosine receptor. *EMBO Journal* **10**, 1677-1682.
- LINDBERG S. & MERCKE U. (1986) Capsaicin stimulates mucociliary activity by releasing substance P and acetylcholine. *European Journal of Respiratory Disease* **68**, 96-106.
- LINDEN J., TAYLER H.E., ROBEVA A.S., TUCKER A.L., STEHLE J.H., RIVKEES S.A., FINK J.S. & REPPERT S.M. (1993) Molecular cloning and functional

expression of a sheep A<sub>3</sub> adenosine receptor with widespread tissue distribution. *Mol.Pharmacol.* **44**, 524-532.

LONDOS C., COOPER D.M.F. & WOLFF J. (1980a) Subclasses of external adenosine receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **77**, 2551-2554.

LONDOS C., COOPER D.M.F. & WOLFF J. (1980b) Subclasses of external adenosine receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **77**, 2551-2554.

LUPICA C.R., CASS W.A., ZAHNISER N.H. & DUNWEDDIE T.V. (1990) Effect of the selective adenosine A<sub>2</sub> receptor agonist CGS21680 on in vitro electrophysiology, cAMP formation and dopamine release in rat hippocampus and striatum. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **252**, 1134-1141.

LYDFORD S.J. & MCKECHNIE K. (1993) Classification of the prostaglandin EP-receptor located on the rat isolated trachea. *Br.J.Pharmacol. Proc. Suppl.* **108**, 72P-1993.

MADARA J.L., PATAPOFF T.W., GILLECE-CASTRO B., COLGAN S.P., PARKOS C.A. & DELP C. (1998) 5'-AMP is the neutrophil-derived paracrine factor that elicits chloride secretion from T84 intestinal epithelial cell monolayers. *Journal of Clinical Investigation* **9**, 2320-2325.

MAENHAUT C., VAN SANDE J., LIBERT F., ABRAMOWITZ M., PARMENTIER M., VANDERHARGEN J.J., DUMONT J.E., VASSART G. & SCHIFFMANN

- S. (1990) RDC8 codes for an adenosine A<sub>2</sub> receptor with physiological constitutive activity. *Biochem.Bioph.Res.Co.* **173**, 1169-1178.
- MARIN M.G., DAVIS B. & NADEL J.A. (1976) Effect of acetylcholine of Cl<sup>-</sup> Na<sup>+</sup> fluxes across dog tracheal epithelium *in vitro*. *Am.J.Physiol* **231**, 1546-1549.
- MARIN M.G., DAVIS B. & NADEL J.A. (1977) marin. *Journal of Applied Pysiology* **42**, 735-738.
- MARKEWITZ B.A., KOHAN D.E. & MICHAEL J.R. (1995) Endothelin-1 synthesis, receptors, and signal transduction in alveolar epithelium: evidence for an autocrine role. *Am.J.Physiol* **268**, L192-L200
- MARQUARDT D.T., GRUBER H.E. & WASSERMAN S.T. (1984) Adenosine release from stimulated mast cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **81**, 6192-6296.
- MARSHALL F.H., PATEL K., LUNDSTROM K., CAMACHO J., FOORD S.M. & LEE M.G. (1997) Characterization of [<sup>3</sup>H]-prostaglandin E<sub>2</sub> binding to prostaglandin EP<sub>4</sub> receptors expressed with Semliki Forest Virus. *Br.J.Pharmacol.* **121**, 1673-1678.
- MASFERRER J.L., ZWEIFEL B.S., MANNING P.T., HAUSER S.D., LEAHY K.M., SMITH W.G., ISAKSON P.C. & SEIBERT K. (1994) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **91**, 3228-3232.

- MCCOY D.E., SCHWIEBERT E.M., HARLSON K.H., WILLEAM S.SPIELMAN & STANTON B.A. (1995) Identification and function of A<sub>1</sub>adenosine receptors in normal and cystic fibrosis human airway epithelial cells. *Am.J.Physiol* **268**, C1520-C1527
- MILLUL V., LAGENTE V., GILLARDEAUX O., BOICHOT E., DUGAS B., MENCIA-HEURTA J.-H., BÉRÉZIAT G., BRAQUET P. & MASLIAH (1991) Activation of guinea pig alveolar macrophages by endothelin-1. *J.Cardiovasc.Pharm.* **17**, S233-S235
- MOTOJIMA S., FRIGAS E., LOEGERIN D.A. & GLEICH G.J. (1989) Toxicity of eosinophil cationic proteins for guinea-pig tracheal epithelium *in vitro*. *Am.Rev.Resp.Dis.* **139**, 801-805.
- MUNSHI R., PANG I.-H., STERNWRIS P. & LINDEN (1991) A<sub>1</sub> adenosine receptors of bovine brain couple to guanine nucleotide-binding proteins G<sub>i1</sub>, G<sub>i2</sub>, and G<sub>o</sub>. *J.Biol.Chem.* **266**, 22285-22289.(Abstract)
- MURRAT B. & ASHBY B. (1997) The long cytoplasmic carboxyl terminus of the prostaglandin E<sub>2</sub> receptor EP<sub>4</sub> subtype is essential for agonist-induced desensitization. *Mol.Pharmacol.* **51**, 343-349.(Abstract)
- NADEL J.A. (1991) Neural endopeptidase modulates neural inflammation. *Eur.Respir.J.* **4**, 745-754.

- NAKANE T. & CHIBA S. (1990) Adenosine constricts the isolated and perfused monkey coronary artery. *Heart Vessels* **5**, 71-75.
- NAKAO A., WATANABE T., TANIGUCHI S., NAKAMURA M., HONDA Z.-I., SHIMIZU T. & KUROKAMA K. (1993) Characterization of the prostaglandin F<sub>2α</sub> receptor of mouse 3T3 fibroblasts and its functional expression. *J.Cell.Physiol.* **155**, 257-264.
- NAMBA T., SUGIMOTO Y., HIRATA M., HAYASHI Y., HONDA A., WATABE A., NEGISHI M., ICHIKAWA A. & NARUMIYA S. (1998) Mouse thromboxane A<sub>2</sub> receptor: cDNA cloning, expression and Northern blot analysis. *Biochem.Bioph.Res.Co.* **184**, 1197-1203.
- NAMBA T., SUGIMOTO Y., NEGISHI M., IRIE A., USHIKUBI F., KAKIZUKA A., ITO S., ICHIKAWA A. & NARUMIYA S. (1993) Alternative splicing of C-terminal tail of prostaglandin E receptor subtype EP<sub>3</sub> determines G-protein specificity. *Nature* **364**, 166-170.
- NATHANSON I., WIDDICOMBE J.M. & BARNES P.J. (1983) Effect of vasoactive intestinal peptide on ion transport across dog tracheal epithelium. *J.Appl.Physiol.* **55**, 1844-1848.
- NEEDLEMAN P., TURK J., JAKSCHIK B.A., MORRISON A.R. & LEFKOWITH J.B. (1986) Arachidonic acid metabolism. *Annu.Rev.Biochem.* **55**, 69-102.



NEGISHI M., SUGIMOTO Y., IRIE A., NARUMIYA S. & ICHIKAWA A. (1993)

Two isoforms of prostaglandin E receptor EP<sub>3</sub> subtype. Different COOH-terminal domains determine sensitivity to agonist-induced desensitization. *J.Biol.Chem.* **268**, 9517-9521.

NIALS A.T., VARDET C.J., DENYER L.H., THOMAS M., SPARROW S.,

SHERPHERD G. & COLEMAN R.A. (1993) AH13205, a selective prostanoid EP<sub>2</sub> receptor agonist. *Cardiovasc.Drug.Rev.* **11**, 165-179.

NINOMIYA H., X.Z.YU, HASEGAWA S. & SPANNHAKE E.W. (1992) Endothelin-1

induces stimulation of prostaglandin synthesis in cells obtained from canine airways by bronchoalveolar lavage. *Prostaglandins* **43**, 401-411.

NISHIGAKI N., NEGISHI M. & ICHIKAWA A. (1996) The Gs-coupled prostaglandin

E receptor subtypes, EP<sub>2</sub> and EP<sub>4</sub>, differ in desensitization and sensitivity to metabolic inactivation of the agonist. *Mol.Pharmacol.* **50**, 1031-1037.

NISHIGAKI N., NEGISHI M., HONDA A., SUGIMOTO Y., NAMBA T.,

NARUMIYA S. & ICHIKAWA A. (1995) Identification of a prostaglandin E receptor 'EP2' cloned from mastocytoma cells as EP4 subtype. *FEBS Lett.* **364**, 339-341.

NOLAND T.D., CARTER C.E., JACOBSON H.R. & BREYER M.D. (1992) PGE<sub>2</sub>

regulates cAMP production in cultured rabbit CCD cells: evidence for dual inhibitory mechanisms. *Am.J.Physiol* **263**, C1208-C1215

- NOVERAL J.P., ROSENBERG S.M., ANBAR R.A., PAWLOWSKI N.A. & GRUNSTEIN M. (1992) Role of endothelin-1 in regulating proliferation of cultured rabbit airway smooth muscle cells. *Am.J.Physiol* **263**, L317-L324
- NYCE J.W. & METZGER W.J. (1997) DNA antisense therapy for asthma in animal model. *Nature* **385**, 721-725.
- O'BANION M.K., WINN V.D. & YOUNG D.A. (1992) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **89**, 4888-4892.
- PATEL K.V., SHETH H.G. & SCHREY M.P. (1997) Stimulation of endothelin-1 secretion by human breast cancer cells through protein kinase A activation: a possible novel paracrine loop involving breast fibroblast-derived prostaglandin E<sub>2</sub>. *Mol.Cell Endocrinol.* **126**, 143-151.
- PEACHELL P.T., COLUMBO M., KAGEY-SOBOTKA A., LICHTENSTEIN L.M. & MARONE G. (1988) Adenosine potentiate mediator release from human lung mast cells. *American Review of Respiratory Disease* **138**, 1143-1151.
- PEAKMAN M.-C. & HILL S.J. (1994) Adenosine A<sub>2B</sub>-receptor-mediated cyclic AMP accumulation in primary rat astrocytes. *Br.J.Pharmacol.* **111**, 191-198.
- PELLETIER S., BATTISTINI B., JENG A.Y. & SIROIS P. (1998) Inhibitor effects of dual endothelin-converting enzyme/neutral endopeptidase inhibitors, CGS26303 and CGS26393, on lipopolysaccharide or interleukin-1b-stimulated release of

endothelin from guinea pig tracheal epithelial cells. *J.Cardiovasc.Pharm.* **31**, S10-S12.

PIERCE K.D., FURLONG T.J., SELBIE L.A. & SHINE J. (1992) Molecular cloning and expression of an adenosine A<sub>2B</sub> receptor from human brain. *Biochem.Bioph.Res.Co.* **187**, 86-93.

PLEWS P.I., ABDEL-MALEK Z.A., DOUPNIK C.A. & LEIKAUF G.D. (1991) Endothelin stimulates chloride secretion across canine tracheal epithelium. *Am.J.Physiol* **261**, L188-L194.

POLOSA R. & HOLGATE S.T. (1997) Adenosine bronchoprovocation: a promising marker of allergic inflammation in asthma? *Thorax* **52**, 919-923.

POUCHER S.M., KEDDIE J.R., SINGH P., STOGALL S.M., CAULKETT P.W.R., JONES G. & COLLINS M.G. (1995) The *in vitro* pharmacology of ZM 241385, a potent, non-xanthine, A<sub>2A</sub> selective adenosine receptor antagonist. *Br.J.Pharmacol.* **115**, 1096-1102.

PRATT A.D., CLANCY G. & WELSH M.J. (1986) Mucosal adenosine stimulates chloride secretion in canine tracheal epithelium. *Am.J.Physiol* **251**, C167-C174.

PRINS B.A., HU R.-M., NAZARIO B., PEDRAM A., FRANK H.J.L., WEBER M.A. & LEVIN E.R. (1994) Prostaglandin E<sub>2</sub> and prostacyclin inhibit the production and secretion from cultured endothelial cells. *J.Biol.Chem.* **269**, 11938-11944.

- QUARLES L.D., HAUPT D.M., DAVIDAI G. & MIDDLETON J.P. (1993)  
Prostaglandin F2a-induced mitogenesis in MC3T3-E1 osteoblasts:role of protein  
kinase-C-mediated tyrosine phosphorylation. *Endocrinology* **132**, 1505-1513.
- RAZANDI M., PEDRAM A., RUBIN T. & LEVIN E.R. (1996) PGE<sub>2</sub> and PGI<sub>2</sub> inhibit  
ET-1 secretion from endothelial cells by stimulating particulate guanylate cyclase.  
*Am.J.Physiol* **270**, H1342-H1349
- RENNICK R.E., MILNER P. & BURNSTOCK G. (1993) Thrombin stimulates release  
of endothelin and vasoressin, but not substance P, from isolated rabbit tracheal  
epithelial cells. *Eur.J.Pharmacol.* **230**, 367-370.
- RIORDAN J.R., ROMMENS J.M., KEREM B.-T., ALON N., ROZMAHEL R.,  
GRZELCZAK Z., ZIELENSKI J., LOK S., PLAZSIC N., CHOU J.-L., DRUM  
M.L., IANNUZZI M.C., COLINS F.S. & TSUI L.C. (1989) Identification of the  
cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA.  
*Science* **245**, 1066-1073.
- RIVKEES S.A. & REPPERT S.M. (1998) RFL9 encodes an A<sub>2B</sub>-adenosine receptor.  
*Mol.Endocrinol.* **6**, 1598-1604
- ROBBINS R.A., BARNES P.J., SPRINGALL D.R., WARREN J.B., KWON O.-J.,  
BUTTERY L.D.K., WILSON A.J., GELLER D.A. & POLLAK J.M. (1994)  
Expression of inducible nitric oxide in human lung epithelial cells.  
*Biochem.Bioph.Res.Co.* **203**, 209-218.

- ROBBINS R.A., SPRINGALL D.R., WARREN J.B., KWON O.-J., BUTTERY L.D.K., WILSON A.J., ADCOCK I.M., RIVEROS-MONERO, MONCADA S., POLLAK J.M. & BARNES P.J. (1997) Incucible nitric oxide synthase is increased in murine lung epithelial cells by cytokine stimulations. *Biochem.Bioph.Res.Co.* **198**, 835-843.
- ROBEVA A.S., WOODWARD R.L., JIN X., GAO Z., BHATTACHARYA S., TAYLOR H.E., ROSIN D.L. & LINDEN J. (1996) Molecular characterization of recombinant human adenosine receptors. *Drug Dev.Res.* **39**, 243-252.(Abstract)
- SAID S.I. (1982) Pulmonary metabolism of prostaglandin and vasoactive peptides. *Am.Rev.Resp.Dis.* **44**, 257-268.(Abstract)
- SAKAMOTO H., SASAKI S., NAKAMURA Y., FUSHIMI K. & MARUMO F. (1992) Regulation of endothelin-1 production in cultured rat mesangial cells. *Kidney Int.* **41**, 350-355.
- SALOMON Y., (1970) Adenylate cyclase assay. *Adv Cyclic Nucleotide Res.* **10**,35-55
- SAMUELSSON B., GRANSTROM E., GREEN K., HAMBERG M. & HAMSTROM S. (1975) Prostaglandins. *Annu.Rev.Biochem.* **44**, 669-695.
- SATOH M., SHIMURA S., ISHARA H., NAGAKI M., SASAKI H. & TAKISHIMA T. (1992) Endothelin-1 stimulates chloride secretion across canine tracheal epithelium. *Respiration* **59**, 145-150.

- SEIBERT K., ZHANG Y., LEAHY K., HAUSER S., MASFERRER j., PERKINS W.,  
LEE L. & ISAKSON P. (1994) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **91**, 12013-12017.
- SHENKER A., GOLDSMITH P., UNSON C. & SPIEGEL A. (1991) The G protein  
coupled to the thromboxane A<sub>2</sub> receptor in human platelets is a member of the  
novelGq family. *J.Biol.Chem.* **257**, 13570-13575.
- SIEGL A.M., SMITH J.B., SILVER M., NICOLAOU K. & AHERN D. (1979)  
Selective binding site for [<sup>3</sup>H]-prostacyclin on platelets. *Journal of Clinical  
Investigation* **63**, 215-220.
- SIGAL E. (1991) The molecular biology of mammalian arachidonic acid metabolism.  
*Am.J.Physiol* **260**, L13-L28.
- SIMON B., KATHER H., KOMMERELL B. (1980) Activation of human colonic  
mucosal adenylate cyclase by prostaglandins. *Adv.Thrombox. Res* **8**, 1617-1620.
- SLEIGH M.A., BLAKE J.R. & LIRION N. (1988) The propulsion of mucus by cilia.  
*Am.Rev.Resp.Dis.* **137** , 726-731.
- SMITH D.L., WILLIS A.L. & MAHMUD I. (1984) Eicosanoid effects on cell  
proliferation in vitro: relevance to atherosclerosis. *Prostag.Leuko.Med.* **16**, 1-10.
- SMITH W.L. & MARNETT L.J. (1990) *Biochim.Biophys.Acta* **1083**, 1-17.
- SONNENBURG W.K. & SMITH W.L. (1988) Regulation of cyclic AMP metabolism in  
rabbit cortical collecting tubule cells. *J.Biol.Chem.* **263**, 6155-6160.

- SONNENBURG W.K., ZHU J. & SMITH W.L. (1990) A prostaglandin E receptor coupled to a pertussis toxin sensitive guanine nucleotide regulatory protein in rabbit cortical collecting tubule cells. *J.Biol.Chem.* **265**, 8479-8483.
- ST-GEORGE J.A., HARKEMA J.R., HYDE D.M. & PLOPPER C.G. (1988) Cell populations and structure-function relationships of cells in the airways. Dans : D. E. Gardner, J. D. Crapo et E. J. Massaro (eds.). *Toxicology of the lung*, Raven Press, New-York, 71-102.
- SUGIMOTO Y., HASUMOTO K., NAMBA T., KATSUYAMA M., NEGISHI M., KAKIZUKA A., NARUMIYA S. & ICHIKAWA A. (1998) Cloning of a cDNA for mouse prostaglandin F receptor. *J.Biol.Chem.* **269**, 1356-1360.
- SUGIMOTO Y., NAMBA T., HONDA A., HAYASHI Y., NEGISHI M., ICHIKAWA A. & NARUMIYA S. (1992) Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin E receptor EP<sub>3</sub> subtype. *J.Biol.Chem.* **267**, 6463-6466.
- TAMAOKI J., KANEMURA T., SAKAI N., ISONO K., KOBAYASHI K. & TAKIZAWA T. (1991) Endothelin stimulates ciliary beat frequency and chloride secretion in canine cultured tracheal epithelium. *Am.J.Resp.Cell Mol.* **4**, 426-431.
- TAMAOKI J., KOBAYASHI K., SAKAI N., CHIYOTANA A., KANEMURA T. & TAKIZAWA T. (1989) Effect of bradykinin on ciliary motility and its modulation by neutral endopeptidase. *Am.Rev.Resp.Dis.* **140**, 430-435.

- TAMAOKI J., KONDO M. & TAKIZAWA T. (1998) Adenosine-mediated cyclic AMP-dependent inhibition of ciliary activity in rabbit tracheal epithelium. *Am.Rev.Resp.Dis.* **139**, 441-445.
- TAMAOKI J., SAKAI N., ISONO K., KANEMURA T., YAMAWAKI I. & TAKIZAWA T. (1991) Effect of platelet-activating factor on bioelectric properties of cultured tracheal and bronchial epithelia. *J.Allergy.Clin.Immun.* **87**, 1042-1049.
- THEIN F.C.K. & WALTERS E.H. (1995) Eicosanoids and asthma: an update. *Prostag.Leukotr.Ess.* **52**, 271-288.
- TRUSSEL L.O. & JACKSON M.B. (1985) Adenosine-activated potassium conductance in cultured striatal neurons. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **82**, 4857-4861.
- UCHIDA Y., NINOMIYA H. & SAOTOME M. (1988) Endothelin, a novel vasoconstrictor peptide, a potent bronchoconstrictor. *Eur.J.Pharmacol.* **154**, 227-238.
- UKENA D., SCHIRREN C.G., KLOTZ K.-N. & SCHWABE U. (1985) Evidence for an A<sub>2</sub> adenosine receptor in guinea pig lung. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **331**, 89-95.
- VAN CALKER D., MULLER M. & HAMPRECHT B. (1978) Adenosine inhibits the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *Nature (London)* **276**, 839-841.



- VANIO M., SAIJONMAA O., FYHRQUIST F. & TORNQUIST K. (1996) Purinergic agonists stimulate the secretion of endothelin-1 in rat thyroid FRLT-5 cells. *J.Cell.Physiol.* **169**, 583-543.
- VERDUGO P., HOHNSON N.T. & YAM P.Y. (1980) b-adrenergic stimulation of respiratory ciliary activity. *J.Appl.Physiol.* **48**, 868-871.
- VITTORI E., MARINI M., FASOLI A., DE FRANCHIS R. & MATTOLI S. (1992) Increased expression of endothelin in bronchial epithelial cells of asthmatic patients and effect of corticosteroids. *Am.Rev.Resp.Dis.* **146**, 1320-1325.
- WALTERS E.H. & DAVIES B.H. (1982) Dual effect of prostaglandin E<sub>2</sub> on normal airways smooth muscle in vitro. *Thorax* **37**, 918-922.
- WANNER A. (1977) Clinical aspects of mucociliary transport. *Am.Rev.Resp.Dis.* **116**, 73-125.
- WANNER A., MAURER D., ABRAHAM W.M., SZEPEFALUSI Z. & SIELEZAK M. (1983) Effects of chemical mediators of anaphylaxis on ciliary function. *J.Allergy.Clin.Immun.* **72**, 663-667.
- WATT A.H., PENNY W.J., SINGH H., ROUTLEDGE P.A. & HENDERSON A.H. (1987) Adenosine causes transient dilation of coronary arteries in man. *Br.J.Pharmacol.* **167**, 1186-1194.

- WELSH M.J. (1987) Electrolyte transport by airway epithelia. *Physiol.Rev.* **67**, 1143-1148.
- WISE H. (1998) Activation of the prostaglandin EP<sub>4</sub> receptor subtype is highly coupled to the inhibition of N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-stimulated rat neutrophil aggregation. *Prostag.Leukotr.Ess.* **58**, 77-84.
- WOODWARD D.F., PEPPERL D.J., BURKEY T.H. & REGAN J.W. (1995) 6-isopropoxy-9-oxoxanthine-2-carboxylic acid (AH 6809), a human EP<sub>2</sub>-receptor antagonist. *Biochem.Pharmacol.* **50**, 1731-1733.
- WU T., RIEVES R.D., LARIVÉE P., LOGUN C., LAWRENCE M.G. & SHELHAMER J.H. (1992) Production of eicosanoids in response to endothelin-1 and identification of specific endothelin-1 binding sites in airway epithelial cells. *Am.J.Resp.Cell Mol.* **8**, 282-290.
- YANAGISAWA M., KURIHARA Y., KIMURA S., TOMOBE Y., KOBAYASHI M., MITSUI Y., YAZAKI Y., GOTO K., MASAKI T. (1988) A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* **332**, 411-415.
- YANG Q., BATTISTINI B., PELLETIER S., BERNIER S.G., GUILLEMETTE G. & SIROIS P. (1998) Effects of diverse beta-2 adrenergic receptor agonists, activators of adenylyl cyclase and cyclic AMP analogues on the basal and stimulated release of endothelin-1. *Submitted to the Br.J.Pharmacol.*

- YANG Q., LAPORTE J., BATTISTINI B. & SIROIS P. (1997) Effect of dexamethasone on the basal and cytokine-stimulated release of endothelin-1 from guinea-pig cultured tracheal epithelial cells. *Can.J.Physiol.Pharm.* **75**,
- ZHOU Q.Y., LI C., OLAH M.E., JOHNSON R.A., STILES G.L. & CIVELLI O. (1992) Molecular cloning and characterization of an adenosine recetor: the A<sub>3</sub> adenosine receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **89**, 7432-7436.